

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse : Dr. Philippe Lesnik et Dr. Laurent Lagrost pour m'avoir fait l'honneur d'être mes rapporteurs. Merci pour votre lecture attentive de ce manuscrit. Je tiens à chaleureusement remercier Dr. Xavier Collet pour avoir accepté de présider ce jury. Je le remercie également pour sa contribution à mon premier article et pour les échanges scientifiques et les bons moments que nous avons pu partager lors des congrès de la NSFA et de l'EAS 2013. Je remercie vivement Dr. Olivier Briand pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. J'ai eu le plaisir de discuter avec vous lors de notre rencontre à l'EAS en juin 2013 et je suis heureux de pouvoir vous présenter, au travers de ce manuscrit, un bilan plus en détail de mes travaux de recherches sur le TICE.

Je remercie Dr. Philippe Costet et Pr. Bertrand Cariou qui ont successivement accepté de diriger ma thèse. Merci à vous Philippe pour m'avoir accueilli dans l'équipe lors de mon arrivée en Master 2 et pour m'avoir soutenu afin que je puisse réaliser cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance pour le projet PCSK9/Hypertension. Merci à vous Bertrand pour avoir accepté de prendre le relai de Philippe après son départ pour les USA. Merci pour la relecture attentive que vous avez portée à ce manuscrit. Enfin, merci à tous les deux pour votre expertise scientifique, vos conseils et pour avoir cru et soutenu ce projet TICE. Merci aussi pour votre implication dans le financement de ma thèse.

Bertrand, encore bravo pour ce fameux bowling de juillet 2013, vous nous avez tous tué (120 !!)

Je veux remercier tout particulièrement Dr. Cédric Le May qui a co-encadré ma thèse. Merci beaucoup Cédric pour m'avoir accompagné au quotidien. Durant ces quatre années, depuis mon Master 2 jusqu'à aujourd'hui, j'ai énormément appris de toi. Tu as toujours répondu présent pour moi. Merci beaucoup pour ton implication dans ma formation à la recherche. Merci beaucoup pour avoir partagé avec moi ton expertise scientifique et pour avoir répondu à toutes mes questions, même quand elles étaient 'bêtes' ou redondantes ! Merci pour m'avoir enseigné des techniques, notamment chirurgicales, que peu de gens maîtrisent. Bon, je reconnais que le maître dépasse toujours l'élève pour la rapidité d'exécution de la dérivation / cannulation in vivo mais j'ai bon espoir de te mettre dans le vent ! Quant à ce qui est de te battre à la course à pieds... bon, je vais aller m'entraîner ! Cédric, merci d'avoir cru en moi pour ce projet TICE. Ton implication à mes côtés dans la mise en place des méthodes d'études in vivo et ex vivo nous a permis d'aboutir à un résultat dont je suis fier. Après trois ans d'un gros travail pour mon premier article, nous sommes les premiers à avoir publié sur le TICE en France ! Il me tarde de voir grandir et aboutir les autres projets que nous avons initiés pour mieux comprendre cette voie métabolique. Cédric, merci pour tes séances de coaching avant mes oraux en congrès : tes conseils et commentaires m'ont toujours fait progresser (et ont payé : bourse NSFA 2011, communication orale et prix poster NSFA 2012, communication orale EAS 2013 !). Merci pour tes précieux conseils et ta fine relecture de ce manuscrit. Aussi, un énorme merci car grâce à toi, je sais maintenant qui est Dieu (Steve Jobs), son fils (Tim Cook) et par où se tourner pour prier : toujours vers un Apple Store ! Enfin, je finirai en te remerciant pour nos débats animés sur la politique française en plateforme de radioactivité avec en fond, un air de Claude François (moi je sais que tu es un fan) ! Merci pour tout Cédric, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi.

Un grand merci aux membres 'seipine' de mon équipe : Dr. Xavier Prieur, Dr. Jocelyne Magré et Lucile Dollet. Merci Xavier pour nos échanges scientifiques, merci pour ton enthousiasme. Merci pour l'implication que tu as eu dans le projet TICE. Jocelyne, merci pour tes conseils lorsque je préparais mon dossier pour rechercher un postdoc. Merci pour avoir traqué les fautes d'orthographe de ce manuscrit. Merci pour tous ces midis où tu m'as beaucoup fait rire à la cantine du CHU (notamment certaines histoires de déguisements et de G.O. !). Lucile, je te souhaite le meilleur pour la suite. J'ai eu beaucoup de chance de t'avoir comme collègue doctorante et je suis fier de t'avoir comme amie. J'aime ta susceptibilité, ton allure, ton côté Marie Tatasse, ton enthousiasme, tes talons ! En plus, tu gères ta science ! J'ai plaisir à me remémorer tout ce que nous avons partagé, les Quick, les sorties et même le pire dont l'histoire d'une porte criminelle et d'une incisive victime.

Merci aux membres 'iPS' de mon équipe : Dr. Karim Si-Tayeb, Dr. Amandine Caillaud et Benoite Champon. Karim, merci beaucoup pour tes conseils pour mon postdoc. Merci pour m'avoir fait découvrir un domaine de recherche passionnant, notamment au travers du projet de recherche que tu mènes ici à l'Institut du thorax. Merci pour tous les bons moments passés avec toi et les Karimettes ! Les Karimettes, vous êtes géniales ! Merci Amandine pour ta gentillesse, ta bonne humeur et tes récits de la Catalogne et de Tahiti. Benoite, c'est génial

d'avoir une collaboratrice comme toi dans l'équipe ! J'ai vraiment aimé partager mes galettes pépites de chocolat avec toi pendant que je préparais mon oral de thèse (on s'est gavé)!

Merci à Lucie Arnaud. Merci pour toutes les FPLC que tu as faites pour moi. Merci Lucie pour ta gentillesse. Tu m'as fait ouvrir les yeux sur des choses que je ne regardais pas.

François, bon vent ! Tu sais où tu vas : tu connais le sujet et le lab. Je te souhaite une belle thèse !

Un merci aux anciens membres de mon équipe : Umberto, Bruno, Morgan, Constance, Maelle, Cédric avec une attention toute particulière à Wieneke. Wieneke, je te souhaite beaucoup de réussite pour ta thèse. J'ai la chance d'avoir une amie Hollandaise maintenant (merci pour ce super barbecue et la piscine) !

Je voudrais remercier les membres de mon comité de thèse : Dr. Vincent Sauzeau et Dr. Bernard Lardeux. Merci Vincent pour ta bienveillance et tes encouragements lors de mes comités de thèse. Merci à Bernard Lardeux pour son implication dans l'avancement de mon projet de thèse et pour m'avoir offert l'opportunité de présenter mes travaux lors de la journée de l'IMAD en juin 2013.

Je souhaite également remercier Pr. Pierre Pacaud, ancien directeur de l'Institut du thorax, pour avoir soutenu ma candidature lors de mon M2. Merci au Pr. Hervé Le Marec, directeur de l'Institut du thorax, pour la dynamique de recherche qu'il donne au laboratoire.

Je remercie Dr. Gervaise Loirand et Nathalie Vaillant pour leur implication dans un projet collaboratif entre nos deux équipes. Je remercie Dr. Anne Lespine, Pr. Eric Letessier et Dr. Mahmood Hussain pour leur implication lors de mon premier travail de thèse.

Merci au Dr. Patricia Lemarchand pour ces excellents conseils et au Dr. Nathalie Gaborit. Nath, t'es une fille super ! You're sexy and you know it ! Merci au Dr. Catherine Mounier pour m'avoir accueilli à l'UQAM.

Un merci chaleureux à tous mes amis co-doctorants de la même promotion : Gwennan, David, Vicent, Maria-Luigia, Mallory, Fayal. Tous, vous êtes top ! Tant d'histoires partagées !

Merci à l'équipe du secrétariat et particulièrement à Anne Mychack et Marie-Pierre Fuchs. Merci à l'équipe de la plateforme animalerie (Virginie, Amandine, Tiphaine, Malek) et de la plateforme radioactivité (Agnès, Anne).

Merci à ceux qui ont financé ma thèse : la fondation d'entreprise Génavie, le NSFA, l'ACRV. Sans vous, cette thèse n'aurait tout simplement pas été possible.

Enfin, un énorme merci à ma famille : vous êtes mon roc. Je vous aime.

Papa, maman, vous êtes mes modèles. Vous êtes moi. Je vous aime.

Macro et Pierro, mes frangins ! Je vous aime. Vous êtes mes modèles.

Vous quatre, vous êtes ma chaire. Rien sans vous.

Bertrand, Sylvie, François-Xavier, Anne-Cécile, Marion, Claire, Martin: je vous aime merci d'avoir été là. Merci pour votre chaleur.

Mamie, je t'aime, merci d'être là. J'aime tout chez toi !

Merci à toute ma famille : oncles et tantes (Nath et Gégé merci pour votre curiosité à mon égard, Isa, merci Flo et Pascal pour m'avoir accueilli chez vous durant mon stage de M1, tata Valérie merci d'être là), cousins et cousines (vous êtes GENIAUUUUX !!!), mon parrain Jean-Bernard et ma marraine Marie-Christine qui, même si nous nous voyons peu, m'influencent et m'inspirent... Mamé, tu seras toujours mon modèle de volonté, de droiture et de justesse, de tendresse. Tu es tellement positive !! Je t'aime. Je vous aime TOUS !

Merci à tous mes potes nantais : Riton (au Népal... bro, tu nous manques... profite de tout) Steph (au Danemark... j'adore ton enthousiasme, ton envie de tout, ta bonne humeur !), Bobby (mon bro, tellement heureux de te connaître ! On a plein de choses à faire ensemble), Sim et Adeline (+ Sheldon, mon pote aussi) votre cœur est plus gros que la terre elle-même, je vous adore ! Sim, je surkiffe tes goûts musicaux (Maman

m'appelle, maman m'appelle...). Merci pour m'avoir ouvert les portes de votre imprimante !! Rémi, Mélo, Eric, Marion, Aurel. Vous êtes top !

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	14
AVANT PROPOS	15
INTRODUCTION	17
1 Généralités sur le cholestérol	15
1.1 Identification et fonctions du cholestérol	15
1.2 Transport du cholestérol et des lipides : les lipoprotéines	15
2 Métabolisme du cholestérol	19
2.1 Origine du cholestérol : cholestérol endogène / cholestérol exogène	21
2.1.1 Synthèse <i>de novo</i> du cholestérol	21
2.1.1.1 Contrôle transcriptionnel du niveau de cholestérol dans les cellules	21
2.1.2 Absorption et transport du cholestérol exogène	23
2.1.2.1 Rappels anatomiques : l'intestin grêle	23
2.1.2.1.1 Anatomie	23
2.1.2.1.2 Histologie	24
2.1.2.1.3 Entérocytes	26
2.1.2.1.4 Le système nerveux entérique	27
2.1.2.1.5 Incrétines	27
2.1.2.2 Absorption intestinale	28
2.1.2.2.1 Aspects quantitatifs	28
2.1.2.2.2 Solubilisation	28
2.1.2.2.3 Captage entérocytaire	29
2.1.2.3 Régulation de l'absorption intestinale du cholestérol	31
2.1.2.4 Export entérocytaire du cholestérol absorbé	33
2.1.2.4.1 Voie des chylomicrons	33
2.1.2.4.2 Voie des HDL	34
2.2 L'apport en cholestérol aux tissus	36
2.2.1 Libération hépatique, transit et remodelage vasculaire	36
2.2.2 Captation du cholestérol : le LDLR	37
2.2.2.1 Identification et fonction	37
2.2.2.2 Régulation du LDLR et de la captation du LDL cholestérol	39
2.2.2.2.1 IDOL	40
2.2.2.2.2 PCSK9	40
Mutations de PCSK9	40
Structure	41
Transport et sécrétion cellulaire de PCSK9	42
PCSK9, une protéine circulante	43
PCSK9, inhibiteur post-transcriptionnel du LDLR	44
Régulation de l'expression de PCSK9	46

PCSK9 dans l'intestin	48
PCSK9, une nouvelle cible thérapeutique	49
2.2.3 Captation du cholestérol non dépendante du LDLR	50
2.2.4 Régulation de la voie endogène d'apport	51
2.3 La voie classique du transport inverse du cholestérol (RCT)	53
2.3.1 Importance du RCT	53
2.3.2 Acteurs du RCT	54
2.3.2.1 Les HDL	54
2.3.2.2 Efflux du cholestérol macrophagique et transporteurs impliqués	54
2.3.2.3 Importance fonctionnelle du système lymphatique dans le RCT	56
2.3.2.4 Protéines du compartiment vasculaire	58
2.3.2.4.1 La HL et l'EL	58
2.3.2.4.2 La LCAT	58
2.3.2.4.3 La PLTP	59
2.3.2.4.4 La CETP	59
Remodelage vasculaire de la distribution du cholestérol et RCT	59
Point sur les inhibiteurs de la CETP	60
2.3.2.5 Captage du cholestérol par le foie : importance dans le RCT	61
2.3.3 Elimination biliaire du cholestérol	62
2.3.3.1 Métabolisme des acides biliaires	62
2.3.3.2 Sécrétion des acides biliaires et du cholestérol dans la bile	63
2.3.3.3 Elimination et réabsorption des acides biliaires	64
2.3.4 Régulation du RCT	65
2.3.4.1 LXR	65
2.3.4.2 FXR	65
2.3.4.3 PPAR	66
2.3.5 RCT et intestin	67
2.4 L'excrétion transintestinale du cholestérol ou TICE	68
2.4.1 Observations initiales	68
2.4.1.1 Preuves indirectes de l'existence du TICE chez les rongeurs	68
2.4.1.2 Preuves indirectes de l'existence du TICE chez l'homme	69
2.4.2 Preuve de l'existence du TICE chez la souris	69
2.4.3 Acteurs moléculaires impliqués	70
2.4.3.1 Origine du cholestérol pour le TICE	70
2.4.3.2 Au niveau de la membrane basolatérale de l'entérocyte	70
2.4.3.2.1 Le récepteur scavenger de classe B, type 1 (SRB1)	70
2.4.3.2.2 LDLR	71
2.4.3.3 Au niveau intracellulaire	71
2.4.3.4 Au niveau de la membrane apicale de l'entérocyte	72
2.4.3.4.1 NPC1L1	72
2.4.3.4.2 ABCG5/G8	72
2.4.3.4.3 ApoAI	72

2.4.4	Le TICE est modulable	73
2.4.4.1	Facteurs présents dans la lumière intestinale	73
2.4.4.2	Modulation nutritionnelle	73
2.4.4.3	Modulation pharmacologique	74
2.4.4.3.1	Les agonistes de LXR stimulent le TICE	74
2.4.4.3.2	Les agonistes de PPAR delta stimulent le TICE	74
2.4.4.3.3	L'ézétimibe	75
2.4.4.3.4	Les statines	75
2.4.5	Contribution relative de la voie biliaire et non biliaire dans le RCT	75
	OBJECTIFS DES TRAVAUX	79
	ARTICLE 1	81
	ARTICLE 2	104
	DISCUSSION GENERALE	127
	BIBLIOGRAPHIE	138

ABREVIATIONS

³ H	Tritium
¹⁴ C	Carbone 14
AB	Acides biliaires
ABC	Adenosine triphosphate Binding cassette
ABCA1	ATP-binding cassette, sous famille A, isoforme 1
ABCB1	ATP-binding cassette, sous famille B, isoforme 1
ABCB4	ATP-binding cassette, sous famille B, isoforme 4
ABCC2	ATP-binding cassette, sous famille C, isoforme 2
ABCG1	ATP-binding cassette, sous famille G, isoforme 1
ABCG5	ATP-binding cassette, sous famille G, isoforme 5
ABCG8	ATP-binding cassette, sous famille G, isoforme 8
ABCG11	ATP-binding cassette, sous famille G, isoforme 11
ACAT2	Acyl cholesterol acyl transferase
ADH	Hypercholestérolémie familiale dominante
AGL	Acides gras libres
Apo	Apolipoprotéine
ApoER2	Apo E receptor
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate
ANSM	Agence Nationale de sécurité du Médicament et des produits de santé
ARIC	Atherosclerosis risk in communities
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri-phosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BAAT	Bile acyl-CoA amino acid N-acyltransferase
BSEP	Bile salt export pump
CA	Cholic acid
Caco-2	Cellules entérocytaires colique humaines
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CCK	Cholécystokinine
CD36	Cluster of Differentiation 36
CDCA	Chenodesoxycholic acid
cDNA	ADN complémentaire
CE	Cholestérol estérifié
CETP	Cholesterol ester transfert protein
Ci	Curie
CL	Cholestérol libre
CM	Chylomicrons
COPII	Coat protein complex II
COS-7	Lignée cellulaire fibroblast-like issus de rein de singe
CPM	Couts par minute
CV	Cardiovasculaire
CYP3A11	Cytochrome P450 3A11
CYP7A1	Cytochrome P450 cholestérol 7 α -hydroxylase A1
CYP2B10	Cytochrome P450 2B10
Da	Dalton
DCA	Deoxycholic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFP	Epidermal growth factor precursor
EL	Endothelial lipase
ER	Récepteur aux estrogènes

FAS	Fatty acid synthase
FCR	Fractional catabolic rate
FGF15/19	Fibroblast growth factor 15/19
FOXO3	Forkhead box O transcription factor 3
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FXR	Farnesoid X receptor
FXRE	Farnesoid X receptor response element
GIP	Glucose-dependent insulintropic polypeptide
GLP1	Glucagon-like peptide 1
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
GWAS	Genome wide association study
HDL	High density lipoprotein
HepG2	Cellules d'hépatocarcinome humain
HL	Hepatic lipase
HF	Hypercholestérolémie familiale
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A
HNF	Hepatocyte nuclear factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial cells
IDL	Intermediate density lipoprotein
IDM	Infarctus du myocarde
IDOL	Inducible degrader of the LDLR
ILLUMINATE	Investigation of lipid level management to understand its impact in atherosclerosis events
IMC	Indice de masse corporelle
INSEE	Institut national de la statistique et des études économiques
INSIG1	Insulin-induced gene 1 protein
IR	Insulin receptor
KO	Knock-out
LCA	Lithocholic acid
LCAT	Lécithine cholestérol-acyltransférase
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LEC	Lymphatic endothelial cell
Lp(a)	Lipoprotéine (a)
LPL	Lipoprotéine lipase
LRP	Low density lipoprotein receptor related protein
LXR	Liver X receptor
LXRE	Liver X receptor response element
mTORC1	Mammalian target of rapamycin 1
MRP2	Multidrug resistance associated protein 2
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
MUC1	Mucin 1
MW	Molecular weight
NPC1L1	Niemann-pick disease, type C1 gene-like 1
NPC1	Niemann-pick type C1
NPC2	Niemann-pick type C2
NR1D1	Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORP5	Oxystérol-binding protein 5
P ₂ Y ₁₃	P2Y purinoceptor 13
PC	Phosphatidylcholine
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin / Kexin type 9
PDIA3	Protein Disulfide, isomerase family A, number 3
PL	Phospholipides
PLTP	Phospholipid transfert protein
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
RCT	Reverse cholesterol transport

RE	Réticulum endoplasmique
RXR	Retinoid X Receptor
S1P	Site-1 protease
S2P	Site-2 protease
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SEC23A	Sec23 homologue A (<i>S. cerevisiae</i>)
SEC24A	Sec24 homologue A (<i>S. cerevisiae</i>)
SHP	Small heterodimer partner
siRNA	ARN interférent
SIRT6	Sirtuin 6
SNE	Système nerveux entérique
SRB1	Scavenger receptor class B member 1
SRE	Sterol Response Element
SREBP	Sterol response element binding protein
TC	Taurocholate
TDC	Taurodeoxycholate
TICE	Transintestinal cholesterol excretion
TG	Triglycérides
TUDC	Tauroursodeoxycholate
VEGFR3	Vascular endothelial growth factor receptor 3
VLDL	Very low density lipoprotein
VLDLR	Very low density lipoprotein receptor

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Structure 2D de la molécule de cholestérol ($C_{27}H_{46}O$) (p. 17)
- Figure 2** Représentation schématique de la structure d'une lipoprotéine (p. 18)
- Figure 3** Schéma général du transport du cholestérol (p. 21)
- Figure 4** Activation de SREBP2 par la déplétion intracellulaire en cholestérol (p. 24)
- Figure 5** Structure de l'intestin grêle (p. 26)
- Figure 6** Structure d'une villosité intestinale (p. 27)
- Figure 7** Mécanisme d'action de LXR (p. 33)
- Figure 8** Représentation schématique de l'absorption entérocytaire et de l'excrétion lymphatique du cholestérol (p. 36)
- Figure 9** Représentation schématique de la voie entéro-hépatique du cholestérol (p. 37)
- Figure 10** Représentation schématique de la voie endogène d'apport du cholestérol aux tissus (p. 39)
- Figure 11** Changement de conformation du LDLR en fonction du pH (p. 40)
- Figure 12** Endocytose et recyclage du LDLR à la membrane (p. 41)
- Figure 13** Schéma illustrant les étapes de maturation de PCSK9 (p. 43)
- Figure 14** Structure cristallographique de PCSK9 (p. 44)
- Figure 15** Transport de PCSK9 du RE vers l'appareil de Golgi (p. 45)
- Figure 16** Effets de PCSK9 sur le LDLR (p. 47)
- Figure 17** Régulation de l'expression de PCSK9 (p. 50)
- Figure 18** Représentation schématique de la voie classique du transport inverse du cholestérol (RCT) (p. 55)
- Figure 19** Rôle des vaisseaux lymphatiques dans le captage et le transport des HDL du liquide interstitiel (p. 59)
- Figure 20** Schéma récapitulatif des voies d'élimination du cholestérol : voie biliaire et voie du TICE (p. 78)
- Figure 21** Schéma récapitulatif des acteurs et modulateurs connus de l'excrétion transintestinale du cholestérol et des objectifs de mon travail de thèse (p. 80)

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** Caractéristiques physiques des lipoprotéines plasmatiques humaines (**p. 19**)
- Tableau 2** Composition des lipoprotéines plasmatiques humaines (**p. 19**)
- Tableau 3** Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines (**p. 20**)
- Tableau 4** Valeurs indicatives sur le métabolisme du cholestérol pour un adulte de 70 kg (**p. 30**)
- Tableau 5** Tableau récapitulatif des acteurs et modulateurs connus du TICE (**p. 136**)

AVANT PROPOS

Les maladies cardiovasculaires (CV) constituent un ensemble de pathologies affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Selon un rapport publié en juillet 2013 par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les maladies cardio-vasculaires restent la principale cause de décès dans le monde. Les maladies coronariennes et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent 13,2 millions de décès en 2011, soit 24% des 54,6 millions de morts enregistrés dans l'année [1]. Elles constituent la deuxième cause de mortalité en France avec 144 343 morts par an soit 27% des décès (INSEE, causes médicales de décès en 2009 [2]). Les maladies coronariennes sont responsables de 56 102 infarctus du myocarde (IDM) et de 36 539 morts par an en France (selon le Bulletin épidémiologique hebdomadaire publié en novembre 2012 par l'Institut de veille sanitaire). D'ici 20 ans, ces maladies devraient rester les premières causes de décès dans le monde avec près de 23,6 millions de personnes qui mourront d'une maladie cardio-vasculaire (cardiopathie ou AVC principalement) [3]. Les conséquences sont également économiques. On évalue ainsi à 28 milliards d'euros par an les coûts liés à la prise en charge des maladies cardiovasculaires [2].

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des grosses artères se caractérisant par le dépôt d'une plaque de lipides (athérome) sur la paroi des artères, entraînant par la suite sa lésion (sclérose) [4]. Les maladies athéromateuses dont les IDM et les AVC, font tous suite à une rupture ou à l'érosion de la plaque d'athérome, entraînant la formation d'un thrombus qui peut venir obstruer la lumière vasculaire [5].

Les principaux facteurs de risques de maladies CV sont le tabac, l'hypertension artérielle, le diabète et les dyslipidémies caractérisées par une concentration plasmatique élevée en LDL cholestérol (Low Density Lipoprotein) et/ou une concentration basse en HDL cholestérol (High Density Lipoprotein).

Selon une étude réalisée entre 1996 et 2007 sur des individus représentant la population générale, 36,9% des adultes étudiés présentaient une hypercholestérolémie [6]. L'hypercholestérolémie, par sa prévalence dans la population générale et par le risque CV induit, est donc un enjeu de santé publique majeur. Le traitement classique des sujets à haut risque CV caractérisés par une hypercholestérolémie repose sur l'administration de statines à des doses appropriées. L'efficacité des statines à réduire la morbi-mortalité en prévention secondaire et dans une moindre mesure en prévention primaire est très documentée par de nombreuses méta-analyses, dont certaines sont très récentes [7][8][9]. Cependant, bien qu'efficace, ce traitement hypocholestérolémiant ne permet pas d'atteindre l'objectif thérapeutique pour le LDL cholestérol chez les patients à haut risque CV, notamment chez les diabétiques. Dans une étude de Ferrières *et al.* publiée en 2010, 52% des sujets à risque CV élevé ont des valeurs de LDL cholestérol supérieures à 1 g/l [10] alors que les dernières recommandations européennes ESC/EAS préconisent chez ces patients un LDL cholestérol inférieur à 0,7 g/l [11]. Il est donc nécessaire de développer des stratégies hypocholestérolémiantes complémentaires.

Dans ce contexte, nous nous intéressons au laboratoire à de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour abaisser la cholestérolémie. Depuis plusieurs années, notre équipe travaille sur PCSK9 qui est un inhibiteur endogène du récepteur aux LDL. Chez l'homme, la perte de fonction de PCSK9 est associée à une baisse du LDL cholestérol plasmatique et à une forte protection CV (pour revue [12]). Actuellement, des inhibiteurs de cette protéine sont en cours de développement clinique [13].

Récemment identifiée, l'excrétion transintestinale du cholestérol ou TICE est une fonction intestinale peu définie dans le métabolisme du cholestérol [14]. Cette voie correspond au transport du cholestérol plasmatique à travers la muqueuse intestinale vers la lumière intestinale. La caractérisation des acteurs moléculaires impliqués et des modulateurs de cette nouvelle voie d'épuration du cholestérol plasmatique est cruciale et pourrait à terme offrir une nouvelle alternative thérapeutique pour lutter contre l'hypercholestérolémie.

INTRODUCTION

1 Généralités sur le cholestérol

1.1 Identification et fonctions du cholestérol

La molécule de cholestérol ($C_{27}H_{46}O$, MW : 386,65 kDa) comprend 4 cycles carbonés composant le noyau stérol et possède un groupement hydroxyle sur le carbone 3. Ce groupe chimique constitue la tête polaire hydrophile (**figure 1**). Le cholestérol n'est pas un substrat énergétique. Il sert principalement de composant des membranes cellulaires animales. En effet, il est un élément majeur qui contribue à la stabilité et au maintien de la structure membranaire en s'intercalant entre les phospholipides formant la bicouche. Il permet de rigidifier la membrane cellulaire et de diminuer la perméabilité membranaire aux molécules hydrosolubles. Il est distribué dans tous les tissus du corps bien qu'il soit particulièrement présent dans le cerveau, la moelle épinière et le foie. Le cholestérol est également un précurseur de nombreuses molécules telles que la vitamine D3, les acides biliaires, les hormones stéroïdiennes produites par la corticosurrénale : cortisol, cortisone et aldostérone ; ou sexuelles : progestérone, œstrogène, testostérone (pour revue [15]).

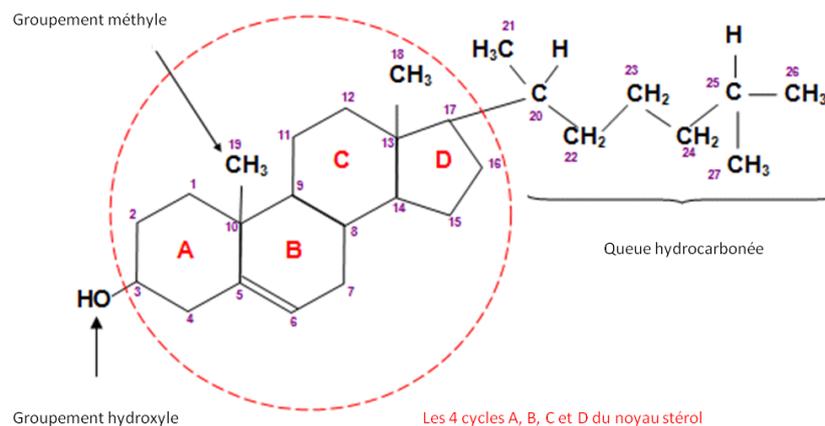


Figure 1. Structure 2D de la molécule de cholestérol ($C_{27}H_{46}O$)

1.2 Transport du cholestérol et des lipides : les lipoprotéines

Les lipides constituent une famille hétérogène de molécules hydrophobes, indispensables au fonctionnement de l'organisme. Leur densité est inférieure à celle de l'eau. Ils sont principalement constitués d'hydrogène, de carbone et d'oxygène. Les lipides peuvent être classés selon leur composition chimique et leur structure. Les principaux lipides sont les triglycérides (TG), les acides gras libres (AGL) qui sont utiles en tant que substrats énergétiques, les phospholipides (PL) et le cholestérol.

En raison de leur hydrophobicité, les lipides ne peuvent pas circuler à l'état libre dans le plasma. Ces molécules sont donc transportées dans la lymphe et le sang au sein de complexes macromoléculaires spécialisés: les

lipoprotéines (**figure 2**). Ces structures subissent des remaniements constants durant leur transit dans le plasma.

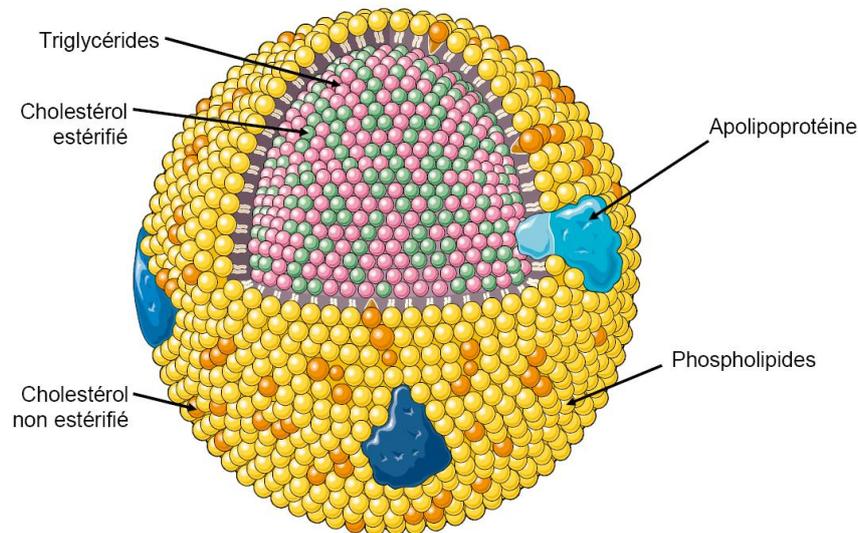


Figure 2. Représentation schématique de la structure d'une lipoprotéine

Les lipoprotéines sont divisés en plusieurs sous groupes en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. L'utilisation de techniques d'ultracentrifugation a permis d'établir cette classification plus fine [16][17][18]. Ainsi, les lipoprotéines sont classées en fonction de leur taille et de leur densité, conditionnées par leur composition lipidique. Les particules les plus riches en lipides sont les moins denses, celles qui sont les plus riches en protéines sont les plus denses.

On distingue aujourd'hui 5 grandes classes de lipoprotéines plasmatiques (**tableau 1**). Les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très faible densité (Very Low Density Lipoprotein, VLDL), les lipoprotéines intermédiaires de faible densité (Intermediate Low Density Lipoprotein, IDL), les lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoprotein, LDL) et les lipoprotéines de haute densité (High Density Lipoprotein, HDL). Les chylomicrons et les VLDL sont principalement riches en TG contrairement au LDL et HDL qui sont majoritairement composées de CE (cholestérol estérifié) (**tableau 2**).

L'importance de cette classification repose sur le fait que de nombreuses études ont montré que le risque de maladies CV est positivement associé aux lipoprotéines de faible densité. Inversement, les particules de haute densité semblent plutôt associées à une réduction du risque [19][20] même si une dernière étude d'analyse mendélienne publiée dans le Lancet ne retrouve pas une association constante et forte entre le HDL cholestérol et le risque CV [21].

TYPE DE LIPOPROTÉINE	MOBILITÉ ÉLECTRO-PHORÉTIQUE	DENSITÉ (g/ml)	TAILLE (nm)	POIDS MOLECULAIRE (kDa)
CM	Pas de migration	< 0,93	75-1 200	100 000
VLDL	préβ	0,93 - 1,006	30-80	6 000
IDL	préβ lent	1,006-1,019	27-5	4 000
LDL	β	1,019-1,063	18-27	1 800
HDL ₂	α	1,063-1,125	9-12	400
HDL ₃	α	1,125-1,210	7-9	200
préβHDL	préβ	1,210-1,250	<7 (disques)	< 80

Tableau 1. Caractéristiques physiques des lipoprotéines plasmatiques humaines [22]

Les lipoprotéines sont des structures complexes, constituées d'un noyau central lipidique hydrophobe composé de triglycérides et de cholestérol estérifié, entouré d'une enveloppe amphiphile associant des lipides hydrophiles (cholestérol non estérifié et phospholipides) et d'apolipoprotéines. Ces dernières déterminent les caractéristiques fonctionnelles des différentes lipoprotéines.

TYPE DE LIPOPROTÉINE	CHOLESTEROL (%)	PROPORTION CE/TG	LIPIDES TOTAUX (%)	PROTEINES (%)	PRINCIPALES APOLIPOPROTÉINES (APO)
CM	4	1/19	99	1	B48, E, C
VLDL	23	1/3,3	92	8	B100, E, C
IDL	43	1/3,5	89	11	B100, E
LDL	58	1/0,23	79	21	B100
HDL ₂	26	1/0,22	60	40	AI, AII, C
HDL ₃	13	1/0,19	43	57	AI, AII, C

Tableau 2. Composition des lipoprotéines plasmatiques humaines [22]

Les apolipoprotéines ont un rôle central dans le métabolisme des lipides. Par leurs propriétés physico-chimiques, elles ont un rôle stabilisateur de l'édifice lipoprotéique. Elles permettent l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines, notamment grâce à leur interaction avec des récepteurs cellulaires spécifiques.

Bien qu'il existe de nombreuses classes d'apolipoprotéines, on distingue trois classes principales (**tableau 3**). Les apolipoprotéines de type A, B et C [23].

NOM	TISSU	DISTRIBUTION	FONCTION
ApoAI	foie, intestin	CM, HDL Structurelle	Activateur physiologique de la LCAT, efflux de cholestérol
ApoAII	foie (intestin)	HDL Structurelle	Activateur/inhibiteur de la HL, efflux de cholestérol
ApoAIV	foie, intestin	CM, HDL	Transport reverse du cholestérol, activateur de la LCAT, métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
ApoAV	foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
ApoB100	foie	VLDL, IDL, LDL	Structurelle, synthèse et sécrétion des VLDL, ligand du récepteur LDLR
ApoB48	intestin	CM	Structurelle, synthèse et sécrétion des chylomicrons, ligand du récepteur B48R
ApoCI	foie (intestin)	CM, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP, activateur de la LCAT, inhibiteur de la liaison aux LDLR, LRP et VLDLR
ApoCII	foie (intestin)	CM, VLDL, HDL	Activateur physiologique de la LPL
ApoCIII	foie (intestin)	CM, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la LPL, inhibiteur de la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG
ApoD (ApoAIII)	foie, intestin, rate pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport reverse du cholestérol (?)
ApoE	foie, macrophage, cerveau	CM, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDLR et LRP
ApoF	foie	LDL (VLDL, HDL)	Inhibiteur de la CETP
ApoG, H, J, L, SAA		HDL	/

Tableau 3. Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines [22]

Les apolipoprotéines de type A (ApoA) sont associées aux HDL alors que les apolipoprotéine de type B (ApoB) sont associées aux CM, VLDL, IDL et LDL. On retrouve de l'apolipoprotéine C (ApoC) principalement sur les VLDL et HDL. L'ApoE est quant à elle présente au sein des particules de type CM, VLDL, IDL et HDL mais pas sur les LDL.

2 Métabolisme du cholestérol

La distribution du cholestérol aux différentes cellules de l'organisme via des lipoprotéines spécifiques s'effectue grâce à l'action combinée de l'ensemble des apolipoprotéines, des enzymes lipolytiques, des protéines de transfert et des récepteurs cellulaires. Le transport du cholestérol par les lipoprotéines se divise en 3 grandes voies (**figure 3**) :

- La voie exogène entéro-hépatique : principalement active en période postprandiale, elle permet le transport des lipides alimentaires de l'intestin vers le foie.
- La voie endogène d'apport aux tissus périphériques : c'est le transport des lipides du foie vers les cellules de l'organisme.
- La voie du transport inverse du cholestérol (RCT) : c'est le retour du cholestérol des cellules de l'organisme vers le foie.

Enfin, deux voies permettent l'élimination du cholestérol de l'organisme :

- La voie biliaire : une part du cholestérol retourne au foie via les HDL et les LDL puis est éliminé dans la bile soit directement, soit après conversion en acides biliaires.
- La voie de l'excrétion transintestinale du cholestérol (TICE) : c'est le passage du cholestérol plasmatique à travers la muqueuse intestinale vers la lumière intestinale.

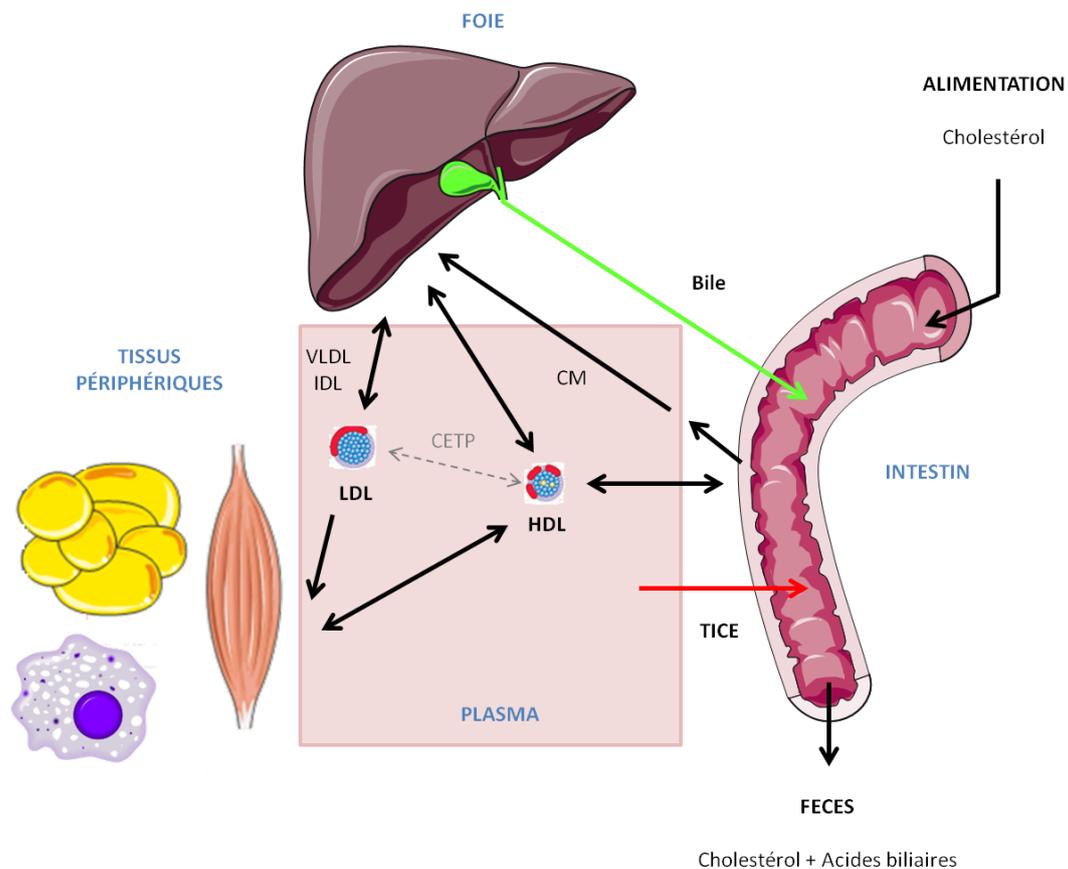


Figure 3. Schéma général du transport du cholestérol

On distingue classiquement trois principaux tissus ayant une implication importante dans le métabolisme des lipoprotéines : l'intestin, le foie et les tissus périphériques.

L'**intestin** permet l'absorption des lipides alimentaires via les entérocytes puis la formation et l'efflux des lipoprotéines de grandes tailles notamment par l'association de TG à l'ApoB48. Les chylomicrons ainsi produits et sécrétés dans le plasma vont permettre le transport entéro-hépatique des lipides. L'intestin a également un rôle majeur dans l'élimination du cholestérol par le TICE.

Le **foie** capte les lipides libérés dans le plasma par l'intestin en période post-prandiale, les réorganise et les redistribue aux tissus périphériques. Il est aussi une porte de sortie pour le cholestérol en permettant son élimination biliaire.

Les **tissus périphériques** captent dans le compartiment plasmatique les lipides dont ils ont besoin pour leur métabolisme, essentiellement du cholestérol et des acides gras libres issus des particules à ApoB. Le cholestérol périphérique en excès retourne au foie ou à l'intestin pour sa réutilisation, son élimination biliaire ou transintestinale.

2.1 Origine du cholestérol : cholestérol endogène / cholestérol exogène

Chez l'homme, le cholestérol peut provenir de deux sources : l'alimentation ou la synthèse *de novo*. Par conséquent, la quantité de cholestérol cellulaire correspond à la résultante d'un équilibre entre l'apport du cholestérol extracellulaire et la synthèse du cholestérol par la cellule. Le cholestérol est essentiel pour de nombreux processus et fonctions biologiques (Cf. § 1.1) aussi bien qu'il est toxique en cas d'excès, notamment au niveau macrophagique suite à l'accumulation intracellulaire de LDL oxydées [24]. La régulation du niveau de cholestérol au sein de l'organisme et au niveau cellulaire est donc vitale.

2.1.1 Synthèse *de novo* du cholestérol

Le foie est l'organe majeur de la synthèse de cholestérol bien que la plupart des cellules de l'organisme soient capables de le synthétiser. La synthèse biochimique du cholestérol à partir d'acetyl-CoA se fait en douze étapes qui font intervenir différentes enzymes. L'enzyme limitante de la voie de synthèse du cholestérol est l'hydroxyméthylglutaryl CoA (HMG-CoA) réductase qui catalyse la synthèse du mévalonate à partir de l'HMG-CoA.

Cette propriété de l'HMG-CoA réductase rend donc sa régulation majeure pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol. Le rétrocontrôle effectué par le cholestérol est le principal mécanisme modulateur de la transcription, de l'expression, de l'activité enzymatique et de la dégradation de cette enzyme. Cette glycoprotéine transmembranaire de 97 kDa située au niveau du réticulum endoplasmique (RE) [25] fait donc l'objet d'un fin contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel par différents facteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol.

2.1.1.1 Contrôle transcriptionnel du niveau de cholestérol dans les cellules : rôle du facteur de transcription SREBP2

La synthèse cellulaire du cholestérol est contrôlée par le facteur de transcription SREBP2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 2). La famille des SREBP est composée de 3 membres : SREBP1a et SREBP1c qui sont responsables de la transcription de gènes impliqués dans la lipogenèse [26][27] et SREBP2 qui après activation va se lier à l'ADN pour induire la transcription des gènes permettant l'augmentation du niveau cellulaire de cholestérol [28].

À l'état basal, SREBP2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 2) forme un complexe avec SCAP (SREBP cleavage-activating protein) ancré au sein de la membrane du RE. Le maintien du complexe SREBP2-SCAP au RE est assuré par la protéine de rétention INSIG1 (Insulin-induced gene 1). SCAP joue un rôle de senseur du cholestérol. Ainsi, lorsque la concentration intracellulaire en cholestérol libre diminue, SCAP change de conformation tridimensionnelle, libérant alors le complexe SREBP2-SCAP de la protéine de rétention INSIG1. SCAP entraîne SREBP2 vers l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de vésicules de type COPII, où il subit un double clivage protéolytique par les protéases S1P et S2P (Site-1 et 2 protease) [28]. Le produit du clivage de SREBP2 migre dans le noyau au niveau des SRE (Sterol Response Element) sur l'ADN où il active la transcription des gènes de la biosynthèse et de la capture du cholestérol dont l'HMG-CoA réductase et le LDLR (**figure 4**). Le cholestérol néo-synthétisé ou nouvellement capté est alors soit directement utilisé pour la fonction cellulaire,

soit estérifié puis stocké ou encore, lorsque la synthèse à lieu dans le foie, le cholestérol est distribué aux cellules des tissus périphériques via les lipoprotéines à ApoB (CM, VLDL, LDL).

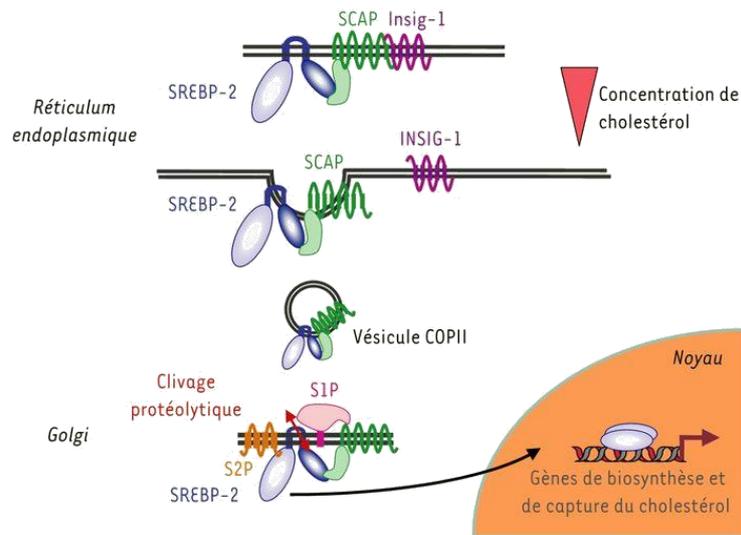


Figure 4. Activation de SREBP2 par la déplétion intracellulaire en cholestérol [29]

Le niveau intracellulaire de cholestérol peut directement réguler l'activité de l'HMG-CoA réductase en favorisant sa dégradation. En effet, le précurseur du cholestérol, le lanostérol, lorsqu'il est présent en forte quantité, favorise la dégradation de l'HMG-CoA réductase dans la voie du protéasome [30]. Un niveau supplémentaire de régulation en cas d'excès de cholestérol dans la membrane du RE est médié par INSIG qui se lie à l'HMG-CoA réductase. L'HMG-CoA réductase est alors ubiquitinylée puis entre dans la voie du protéasome pour sa dégradation [31].

L'HMG-CoA réductase est la cible des statines qui représentent une classe pharmacologique de molécules hypocholestérolémiantes. Les statines vont inhiber la synthèse endogène du cholestérol et augmenter l'activité de SREBP2, stimulant ainsi l'expression du LDLR [32].

SREBP2 est aussi régulé par des facteurs tel que SIRT6 (Sirtuin 6). En effet, SIRT6 qui a plusieurs activités enzymatiques comme la désacétylation des histones, a été identifié comme un facteur essentiel pour la régulation de ce gène. D'abord, il a été montré chez des souris que la surexpression systémique de SIRT6 réduit la quantité de LDL cholestérol sous régime standard ou riche en gras [33]. Puis, la preuve directe de l'implication de SIRT6 dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol a été apportée par Tao *et al.* [34]. Cette équipe a montré chez la souris que la déficience de SIRT6 au niveau hépatique induit une élévation de la concentration plasmatique en cholestérol. En fait, SIRT6 est mobilisé par le facteur de transcription FOXO3 (Forkhead box O transcription factor 3) au niveau du promoteur du gène codant SREBP2, modulant ainsi son expression et celle de ses gènes cibles, notamment l'HMG-CoA réductase. De façon intéressante, FOXO3 a déjà été impliqué dans l'homéostasie du cholestérol [35], cependant, son impact varie en fonction du modèle étudié. Il ressort néanmoins des travaux de Tao *et al.*, un rôle important de SIRT6 et de FOXO3 dans la

régulation de l'homéostasie du cholestérol via la régulation de l'expression hépatique du gène codant SREBP2. Des études complémentaires seraient nécessaires pour mieux comprendre son mécanisme d'action.

Les miRNA sont des petites molécules d'ARN simple brin non codantes d'environ 22 nucléotides. Elles régulent l'expression de gènes à un niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Codés par l'ADN nucléaire eucaryote, les miRNA fonctionnent via l'appariement à des séquences complémentaires sur des molécules d'ARNm, entraînant la répression de la traduction ou la dégradation de sa cible. La séquence codante pour le miRNA miR-33 est présente au niveau de l'intron 16 de la forme humaine de SREBP2 et est donc exprimée de façon concomitante à l'ARN de SREBP2. miR-33 réduit l'expression de la protéine ABCA1 (ATP-binding cassette, sous famille A, isoforme 1), un régulateur clé de la synthèse des HDL qui permet l'efflux du cholestérol des cellules vers l'ApoA1. En effet, le niveau protéique d'ABCA1 dans le foie est plus important chez des souris déficientes pour miR-33 par rapport à des souris sauvages. De plus, les souris déficientes pour miR-33 présentent une quantité plasmatique de HDL cholestérol plus importante que des souris sauvages. Par ailleurs, ABCG1 qui est aussi impliqué dans la maturation des HDL, a été mis en évidence comme cible de miR-33 [36][37]. ABCA1 et ABCG1 sont modulés dans le foie mais aussi au niveau macrophagique par miR-33 [37]. NPC1 (Niemann-Pick C1) est une protéine qui permet le transport intracellulaire du cholestérol et qui a aussi été identifiée comme une cible de miR-33. Enfin, l'expression de SIRT6 et d'ABCB11 qui permet l'efflux des acides biliaires dans la bile au niveau des hépatocytes est inhibée par miR-33 [38]. Ainsi, l'activation de l'expression de SREBP2 conduisant à la co-expression de miR-33 réduit le RCT via une diminution de la synthèse des HDL, de l'efflux du cholestérol et de la sécrétion biliaire [39]. De façon intéressante, un traitement avec un anti-miR-33 stimule le RCT et réduit l'athérosclérose chez des souris déficientes pour le LDLR [40]. Des anti miR-33 pourraient ainsi être développées en clinique pour le traitement de l'athérosclérose.

2.1.2 Absorption et transport du cholestérol exogène

2.1.2.1 Rappels anatomiques : l'intestin grêle

2.1.2.1.1 Anatomie

L'intestin grêle débute après l'estomac pour se terminer au niveau de la valvule iléo-caecale. Chez un homme adulte, c'est un tube mesurant 2,5 cm de diamètre sur une longueur de 6 mètres replié en de nombreuses boucles dans la cavité abdominale. Le maintien en place de ses repliements est permis par la présence du mésentère et du péritoine. L'intestin grêle est vascularisé par l'artère mésentérique supérieure, issue de l'aorte abdominale et par la veine porte, qui conduit le sang vers le foie. Les canaux lymphatiques de l'intestin grêle viennent se déverser dans le canal thoracique qui débute dans l'abdomen puis traverse le thorax et vient se jeter dans la veine sous-clavière gauche. L'intestin grêle est subdivisé en trois segments :

Le duodénum correspond à sa partie supérieure et est séparé de l'estomac par le sphincter pylorique. Il forme un repli de 25 centimètres en entourant le pancréas et est le lieu de déversement du canal cholédoque pour la bile et du canal de Wirsung pour les enzymes pancréatiques au niveau du sphincter d'Oddi.

Le jéjunum correspond à la partie centrale de l'intestin grêle et mesure environ 2,5 mètres, soit les 2/5^{ème} de l'intestin grêle.

L'iléon représente les 3/5^{ème} distaux de l'intestin grêle et fait suite au jéjunum sans démarcation anatomique nette entre les deux segments.

Chez la souris, l'intestin grêle est long d'environ 30 cm et a un calibre relativement uniforme du pylore de l'estomac jusqu'au cæcum. Ce dernier qui est volumineux, correspond à une poche de stockage qui n'existe pas chez l'homme.

2.1.2.1.2 Histologie

La paroi intestinale est composée de plusieurs couches tissulaires (**figure 5**) qui sont, de la plus externe vers la lumière intestinale : la séreuse, la musculuse constituée d'un feuillet de fibres musculaires longitudinales, puis d'un feuillet de fibres musculaires circulaires, la sous muqueuse et la muqueuse qui correspond au chorion, tissu conjonctif recouvert par l'épithélium intestinal. La sous muqueuse et la muqueuse sont séparées l'une de l'autre par la *muscularis mucosae* qui correspond à un feuillet de fibres musculaires lisses.

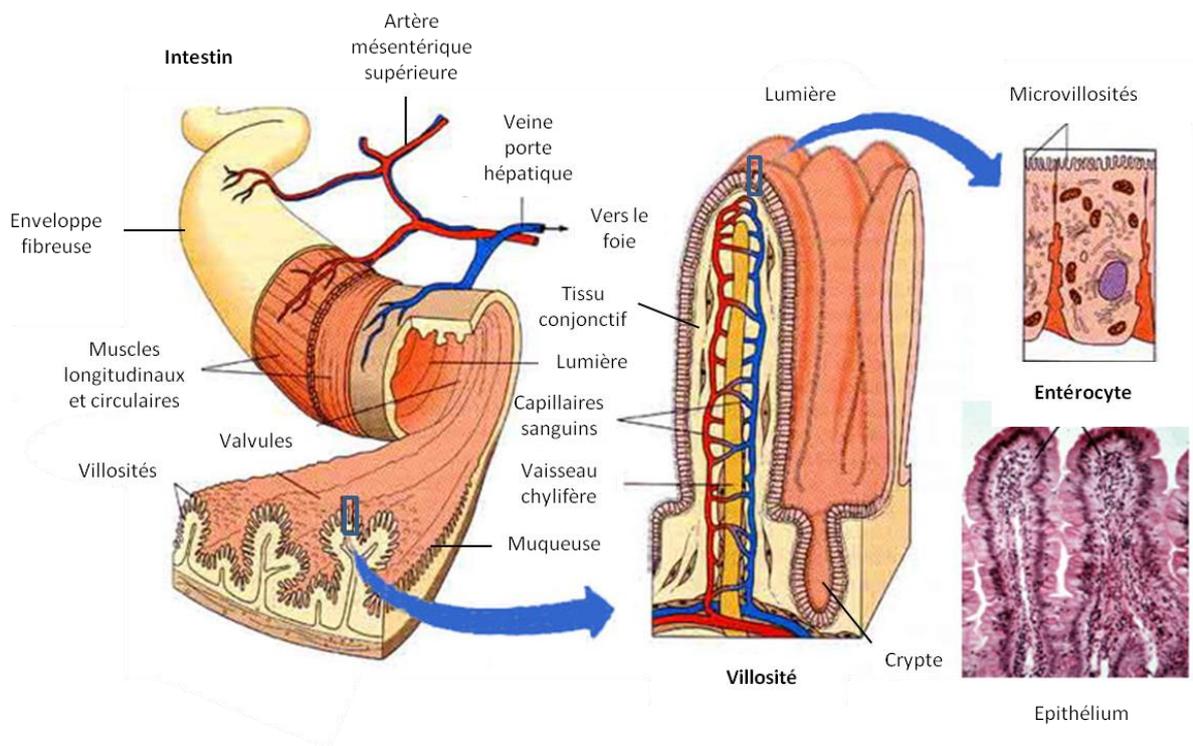


Figure 5. Structure de l'intestin grêle

La progression des aliments dans l'intestin grêle est assurée par la contraction des fibres musculaires de la musculuse via des mouvements de péristaltisme et des mouvements de segmentation qui facilitent l'absorption.

Dans ce même but, la muqueuse intestinale offre une très grande surface de contact avec les aliments en formant de gros plis circulaires : les valvules conniventes. La muqueuse peut être étagée en deux niveaux : le niveau des villosités et le niveau des cryptes (**figure 6**).

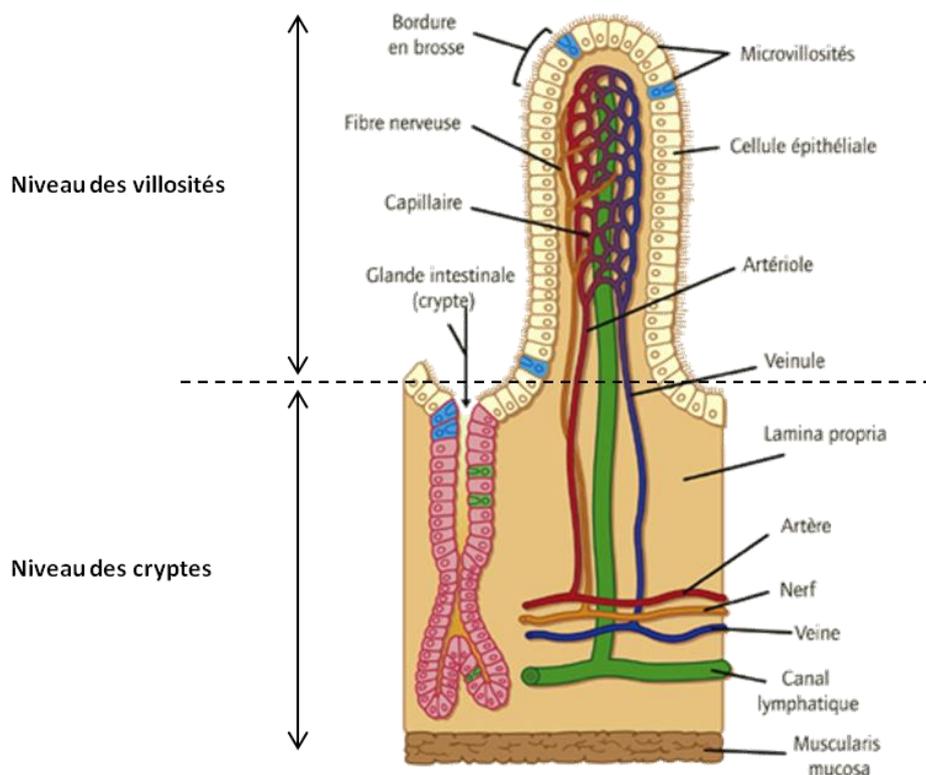


Figure 6. Structure d'une villosité intestinale

Au niveau des villosités

Chaque villosité décrit une projection dans la lumière de l'intestin, l'ensemble des villosités formant ainsi un tapis à sa surface de la muqueuse. Dans chaque villosité on retrouve : un réseau de capillaires sanguins en position sous épithéliale et un vaisseau lymphatique central en cul-de-sac ou chylifère. Les capillaires sanguins permettent l'apport en oxygène aux cellules de la muqueuse et la collecte des nutriments hydrophiles qui sont absorbés. Le chylifère collecte les composés hydrophobes absorbés tels que les lipides et les vitamines liposolubles qui sont ensuite excrétés dans ce conduit sous la forme de complexe lipides-protéines, les chylomicrons.

L'épithélium couvrant chaque villosité est constitué de quatre types cellulaires : des entérocytes, des cellules caliciformes, des cellules neuroendocrines et au niveau de l'iléon, des cellules M.

- Les entérocytes (Cf. § 2.1.2.1.3) représentent plus de 90% des cellules de l'épithélium.
- Les cellules caliciformes sont des cellules productrices de mucus. Le mucus produit participe à la formation du glycocalyx qui recouvre la surface de l'épithélium intestinal notamment afin de le protéger des enzymes digestives présentes dans la lumière.
- Les cellules neuroendocrines sont à l'origine de plusieurs types de sécrétion hormonale. Elles permettent notamment la production de la cholécystokinine (CCK) et d'incrétines (GLP1, GIP). La CCK

active la sécrétion pancréatique et la contraction de la vésicule biliaire suite à l'arrivée de peptides et d'acides gras dans l'intestin. Les incrétines modulent l'homéostasie du glucose en stimulant la sécrétion d'insuline en inhibant celle du glucagon (Cf. § 2.1.2.1.5).

- Les cellules M (microfold cells) qui sont des cellules du système immunitaire.

Au niveau des cryptes

Entre les villosités se situent des cryptes glandulaires profondément enfoncées dans la muqueuse. On y observe cinq types cellulaires : des cellules caliciformes, des entérocytes, des cellules « intermédiaires », des cellules neuroendocrines et au fond des cryptes, des cellules de Paneth.

- Les entérocytes, bien que moins matures, les cellules caliciformes et les cellules neuroendocrines sont les mêmes que sur les villosités. Les entérocytes y sont moins nombreux, au profit des cellules neuroendocrines.
- Les cellules « intermédiaires » sont des cellules immatures, encore capables de se diviser, et situées vers le fond des cryptes. Elles peuvent se différencier en entérocytes ou en cellules caliciformes.
- Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes et contribuent à la défense de la barrière muqueuse intestinale

Les cellules de l'épithélium intestinal se renouvellent très rapidement (4 à 5 jours) par migration et desquamation cellulaire en partant de la partie inférieure des cryptes jusqu'au sommet des villosités.

2.1.2.1.3 Entérocytes

Les entérocytes sont les cellules les plus nombreuses de l'épithélium intestinal et sont le lieu clé d'importants mécanismes du métabolisme du cholestérol. Ce sont des cellules polarisées qui permettent les échanges entre la lumière intestinale, au travers de la membrane apicale, et le compartiment lymphatique et sanguin, au travers de la membrane basolatérale. Ils présentent de nombreux replis au niveau de la membrane cytoplasmique en vue de la lumière intestinale. Ces replis rectilignes de même calibre (0,1 μm) et de même longueur (1 à 2 μm) sont des microvillosités. Environ 600 de ces microvillosités recouvrent la surface de chaque entérocyte, on parle alors de membrane en bordure en brosse.

Cette structure particulière augmente considérablement la surface membranaire du pôle apical de la cellule et, de ce fait, joue un rôle majeur dans les phénomènes d'absorption. De très nombreuses enzymes sont présentes au sein du glycocalyx qui recouvre les entérocytes et au sein de la membrane en bordure en brosse. Ces diverses enzymes assurent, entre autre, l'hydrolyse de certains lipides qui peuvent ensuite être captés par les transporteurs de la membrane en bordure en brosse afin d'être efflués vers la circulation lymphatique et sanguine.

Les entérocytes sont fortement liés les uns aux autres par la présence de jonctions serrées au sein de leur membrane latérale formant ainsi une barrière imperméable aux composés présents dans la lumière intestinale. La présence de protéines transmembranaires comme les cadhérines et les desmosomes permettant de verrouiller les cellules les unes aux autres.

2.1.2.1.4 Le système nerveux entérique

Le système nerveux entérique (SNE) est une subdivision du système nerveux autonome (pour revue [41][42]). Il est connecté au système nerveux central via le nerf vague. Le SNE constitue un réseau neuronal distribué tout le long du tube digestif qui est organisé en deux plexus principaux : le plexus sous-muqueux et le plexus myentérique.

- Le plexus sous-muqueux est localisé entre la couche musculaire circulaire et la muqueuse intestinale. Il contrôle les fonctions de la muqueuse.
- Le plexus myentérique est situé entre la couche musculaire circulaire et la couche musculaire longitudinale. Il contrôle majoritairement la motricité digestive.

Ces deux plexus sont reliés entre eux par des interconnexions et forment ainsi une même unité fonctionnelle. Au sein des plexus, les neurones sont organisés en ganglions qui sont reliés par des fibres ganglionnaires. Le SNE est composé de trois types cellulaires distincts : les neurones, les cellules gliales et les cellules souches neuronales.

Le SNE a un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale par :

- Le contrôle de la motilité digestive notamment le réflexe péristaltique
- Le contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale notamment du transport d'électrolytes, de la production de mucus et de la perméabilité paracellulaire
- Le contrôle de la prolifération cellulaire de l'épithélium
- Le contrôle du flux sanguin intestinal.

2.1.2.1.5 Incrélines

Les incrélines, GLP1 (Glucagon-like peptide-1) et GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) sont des hormones gastro-intestinales qui stimulent la sécrétion d'insuline. Ces hormones peptidiques sont sécrétées lors de la prise alimentaire suite à l'augmentation de la glycémie par les cellules K (présentes au sein du duodénum et du jéjunum proximal) pour le GIP et L (présentes au niveau de l'iléon et le colon) pour le GLP1. En agissant directement sur la cellule β du pancréas, ces hormones vont potentialiser l'effet du glucose sur la sécrétion d'insuline postprandiale. McIntyre et al. ont montré que l'administration d'un bolus de glucose par voie orale induit une plus forte sécrétion d'insuline que l'administration du même bolus par voie intraveineuse [43]. On parle alors d'effet incréline. En effet, le GLP1 et le GIP sont responsables d'environ 50% de l'insulinosécrétion (pour revue [44]).

2.1.2.2 Absorption intestinale

2.1.2.2.1 Aspects quantitatifs

On estime qu'environ 50% du cholestérol présent dans la lumière intestinale est absorbé [45], le reste est directement éliminé dans les fèces (**tableau 4**). Le régime alimentaire apporte en moyenne 400-500 mg de cholestérol par jour. Le cholestérol d'origine biliaire représente quant à lui de 800 à 1200 mg de cholestérol par jour faisant du cholestérol biliaire la source la plus importante de cholestérol pour l'absorption intestinale via le cycle entérohépatique. Autrement dit, la voie d'apport alimentaire représente 1/3 du cholestérol absorbé et la voie d'apport interne qui correspond au cholestérol excrété par l'organisme puis réabsorbé représente les 2/3 restants [46]. L'importance de la contribution intestinale dans l'efflux actif du cholestérol reste à ce jour encore inconnue.

ORIGINE ET FLUX DU CHOLESTEROL	MASSE
Cholestérol total	160 g
Cholestérol plasmatique total	8 g
Apport alimentaire	400 mg/jour
Absorption alimentaire (\pm 50 et 60%)	200 - 240 mg/jour
Synthèse endogène (12 mg/kg/jour)	840 mg/jour
Sécrétion de stérols neutres	1 g/jour
Excrétion biliaire	1 g/jour
Desquamation cellulaire intestinale	250 - 400 mg/jour
Excrétion intestinale	?

Tableau 4. Valeurs indicatives du métabolisme du cholestérol pour un adulte de 70 kg [47][48]

2.1.2.2.2 Solubilisation

Suite à l'action des lipases dans la lumière intestinale, notamment de la cholestérol estérase qui va permettre l'hydrolyse du cholestérol estérifié (CE), les gouttelettes lipidiques issues de la digestion gastrique sont progressivement transformées en microémulsions de plus petite taille. Ces microémulsions lipidiques composées de PL, TG, acides gras et cholestérol libre vont ensuite subir une étape de solubilisation grâce aux acides biliaires sécrétés dans la lumière intestinale, permettant alors la formation des micelles mixtes. Ces micelles sont ainsi nommées par opposition aux micelles simples (3 nm de diamètre) qui sont formées spontanément par agrégation d'acides biliaires. La taille et la forme des micelles mixtes (4-8 nm de diamètre) varient en fonction des concentrations relatives de leurs différents constituants et plus particulièrement en fonction de leur quantité en phospholipides et acides biliaires.

Sécrétés par le foie puis stockés dans la vésicule biliaire pour enfin être déversés dans la lumière intestinale lors des repas, les acides biliaires vont avoir un rôle de détergents. Leur présence est indispensable à l'absorption

du cholestérol. En effet, l'absorption du cholestérol est considérablement réduite dans des modèles animaux génétiquement modifiés présentant une absence d'excrétion d'acides biliaires ou, sur des animaux au canal biliaire ligaturé chirurgicalement [49]. Par exemple, les souris déficientes pour la CYP7A1, une enzyme clé du métabolisme du cholestérol, ont une absorption intestinale du cholestérol quasi nulle. De fait, ces souris présentent un pool d'acides biliaires drastiquement réduit [49]. La quantité de cholestérol absorbé est donc directement corrélée au pool d'acides biliaires présent au niveau intestinal [50]. De plus, la nature des acides biliaires présents au sein des micelles va avoir une influence sur l'absorption du cholestérol. En effet, Wang *et al.* ont montré chez des souris une corrélation positive entre l'indice d'hydrophobicité du pool d'acides biliaires et l'absorption intestinale du cholestérol [51]. Les acides biliaires les plus hydrophobes (l'acide cholique et l'acide deoxycholique) augmentent fortement la solubilisation micellaire du cholestérol et de ce fait, favorisent son absorption.

La présence de phospholipides dans la bile est également indispensable, notamment à travers leur rôle d'accepteur du cholestérol. Ainsi, des souris déficientes pour le transporteur ABCB4, qui permet l'efflux des PL dans la bile, ont une réduction drastique de la quantité de cholestérol biliaire [52].

Avant que les molécules de cholestérol présentes dans la lumière intestinale puissent interagir avec ses transporteurs présents au sein de la bordure en brosse des entérocytes, elles doivent passer une barrière aqueuse (100-500 μm) dite de *diffusion localisée* à l'interface lumière intestinale – membrane apicale entérocytaire. La diffusion des molécules de cholestérol à partir des micelles à travers cette couche d'eau *non agitée* est un processus relativement lent (pour revue [48]). Le manteau muqueux intestinal a également un rôle important dans la diffusion et le passage du cholestérol vers la bordure en brosse. Ainsi, MUC1 qui est une glycoprotéine liée à la membrane apicale des entérocytes et qui joue un rôle essentiel dans la formation d'une barrière protectrice au niveau de la surface épithéliale de la muqueuse est nécessaire pour une absorption intestinale normale du cholestérol. En effet, des souris invalidées pour le gène codant MUC1 présentent une réduction de 50% de l'efficacité d'absorption intestinale du cholestérol [53].

2.1.2.2.3 Captage entérocytaire

Le cholestérol va être internalisé dans la cellule par l'action de différents transporteurs membranaires. Le cholestérol libre (CL) est principalement capté par le transporteur Niemann Pick C1 Like 1 (NPC1L1) puis internalisé dans la cellule entérocytaire [54].

Le transporteur NPC1L1 a été mis à jour en 2004 grâce aux travaux d'Altman *et al.* à partir de cDNA issus de muqueuse jéjunale de rat. Cette protéine a été décrite comme étant limitante pour l'absorption entérocytaire du cholestérol sous sa forme libre [54]. Ce transporteur exprimé au niveau de la membrane apicale des entérocytes est inhibé par l'ézétimibe, une molécule hypocholestérolémiant utilisée en clinique [55]. En effet, chez des souris déficientes pour NPC1L1, l'absorption intestinale de cholestérol radiomarqué administré par gavage est réduite de 69% par rapport à des souris contrôles. Un traitement à l'ézétimibe chez ces animaux n'entraîne pas de baisse supplémentaire de l'absorption du cholestérol, suggérant une action de l'ézétimibe dépendante de NPC1L1 [54]. En 2005, Garcia *et al.* ont confirmé que la glycoprotéine NPC1L1 était la cible de l'ézétimibe par la mise en évidence de la liaison de la drogue au niveau la bordure en brosse des entérocytes

qui expriment NPC1L1 et inversement, par son absence de liaison au niveau de la bordure en brosse entérocytaire chez des souris déficientes pour ce transporteur [55]. De plus, des souris déficientes en ApoE présentent une hypercholestérolémie et une plus grande susceptibilité à l'athérosclérose [56]. De façon intéressante, le croisement de ces animaux avec des souris déficientes pour NPC1L1 conduit à la production de souris qui sont protégées vis-à-vis de l'athérosclérose [57].

SRB1 (Scavenger Receptor class B type 1) est une protéine transmembranaire de 82 kDa qui est notamment exprimée au niveau intestinal et plus particulièrement au niveau des membranes apicales et basolatérale des entérocytes [58]. En 1998, Hauser *et al.* ont montré que ce transporteur était impliqué dans l'absorption entérocytaire du cholestérol alimentaire [59]. En 2006, l'équipe de Collet *et al.* met en évidence que chez des souris surexprimant SRB1 spécifiquement au niveau intestinal, l'absorption du cholestérol est augmentée [60]. Les travaux de Mardones *et al.* précédemment publiés mettent néanmoins en avant une implication secondaire et non limitante de SRB1 dans l'absorption du cholestérol, contrairement à NPC1L1. En effet, l'inactivation totale de SRB1 chez la souris entraîne une légère augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol sous régime standard [61].

CD36 est une glycoprotéine membranaire de la même famille que SRB1 et qui est exprimée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales de l'intestin [62]. CD36 semblerait avoir un rôle dans l'absorption intestinale du cholestérol cependant, son implication reste mal caractérisée [63][64]. En 2009 les travaux de Nguyen *et al.* mettent en évidence que chez des animaux déficients pour SRB1 et/ou CD36, l'efficacité absorbative au niveau de la membrane de la bordure en brosse des entérocytes est équivalente à celle des souris contrôles sous régime standard [65]. Cette étude renforce donc l'hypothèse d'un effet facilitateur mais non limitant de l'absorption du cholestérol par les transporteurs SRB1 et CD36.

L'absorption intestinale de cholestérol est donc la résultante d'un processus actif faisant majoritairement intervenir le transporteur pivot NPC1L1.

2.1.2.3 Régulation de l'absorption intestinale du cholestérol

L'absorption intestinale du cholestérol est modulée par différents acteurs : des récepteurs nucléaires tels que LXR (Liver X Receptor), PPAR δ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor delta) et des acteurs nutritionnels tels que les phytostérols.

Deux isoformes de LXR ont été identifiées, LXR α et LXR β . LXR α est exprimé dans le foie, l'intestin grêle, le tissu adipeux, les macrophages tandis que LXR β est exprimé de façon ubiquitaire [66]. LXR agit comme un senseur du cholestérol. Il est activé par les dérivés du cholestérol comme les oxystérols [67], qui sont ses ligands endogènes, mais aussi par des agonistes synthétiques spécifiques comme le T0901317 ou l'ATI-829 [68]. Comme beaucoup de récepteurs nucléaires, LXR forme un hétérodimère obligatoire avec le Retinoid X Receptor (RXR) et se lie à l'ADN au niveau des LXRE (Liver X Receptor Response Element) présents au sein du promoteur de ses gènes cibles. La présence des corépresseurs associés au complexe empêche la transcription de ces gènes.

En conditions physiologiques, l'augmentation intracellulaire de la quantité d'oxystérols est le reflet d'un niveau élevé de cholestérol : LXR est alors activé. Ainsi, suite à la liaison du complexe LXR/RXR à son ligand (cholestérol, oxystérols, T0901317...), le complexe change de conformation tridimensionnelle ce qui induit la libération des corépresseurs et le recrutement de co-activateurs. Ceci entraîne alors la transcription des gènes cibles de LXR [69] (**figure 7**).

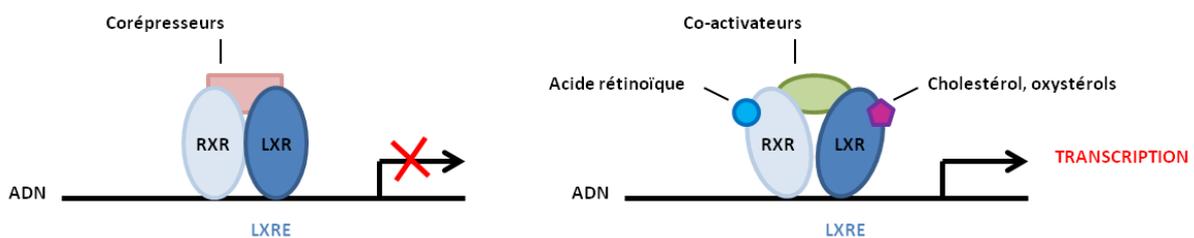


Figure 7. Mécanisme d'action de LXR

Chez la souris, l'activation de LXR par le T0901317 induit une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol due à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'efflux entérocytaire du cholestérol tels que l'hétérodimère ABCG5/G8 [70]. ABCG5/G8 forme un transporteur qui est présent au sein de la membrane apicale des entérocytes [71] et qui régule négativement l'absorption intestinale du cholestérol [72]. En outre, l'expression génique de NPC1L1 est également diminuée dans l'intestin par un traitement avec un agoniste de LXR [73].

On connaît trois isoformes du récepteur nucléaire PPAR : PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ [74]. Plus particulièrement, PPAR δ est exprimé de façon ubiquitaire avec un niveau important de transcrit dans l'intestin grêle [75]. PPAR δ joue un rôle de modulateur de l'homéostasie des acides gras, du glucose et du cholestérol. Chez des souris, Van der Veen *et al.* ont montré que l'activation de PPAR δ par un agoniste de synthèse de haute affinité, le GW610742, permet de réduire l'absorption intestinale du cholestérol de 43%. Les auteurs expliquent cette

réduction de l'absorption par une baisse de l'expression du gène codant NPC1L1 principalement dans le jéjunum et l'iléon des souris traitées [76].

Les phytostérols sont des stérols d'origine végétale, présents dans l'alimentation mais non nutritifs et qui ont une structure moléculaire similaire à celle du cholestérol. Ils permettent une réduction de l'absorption du cholestérol par leur substitution au cholestérol présent dans les micelles mixtes [77]. Ceci s'explique principalement par les propriétés physico-chimiques des phytostérols : ils ont une plus grande hydrophobicité que le cholestérol et sont des molécules chargées. Les phytostérols ont donc une plus forte affinité pour les micelles que le cholestérol. De plus, les phytostérols empruntent les mêmes voies moléculaires de captage et d'efflux via les transporteurs NPC1L1 et ABCG5/G8. Les phytostérols libres ou estérifiés entrent ainsi directement en compétition avec le cholestérol pour leur internalisation et leur sortie des entérocytes, limitant de fait l'absorption du cholestérol [48]. De nombreuses études ont montré une diminution du niveau des LDL plasmatiques de l'ordre de 10% suite à la supplémentation du régime alimentaire en phytostérols sur des modèles normo- ou hypercholestérolémiques [78][79][80][81].

Plusieurs agents pharmacologiques vont moduler l'absorption intestinale :

- l'ézétimibe, qui inhibe NPC1L1
- les séquestrants des d'acides biliaires, qui se lient aux acides biliaires empêchant ainsi leur réabsorption intestinale et stimulant leur production [82]. Néanmoins, l'action hypocholestérolémiante principale des séquestrants des d'acides biliaires est l'augmentation du catabolisme des LDL.

Les agents cités en exemple ci-dessus vont limiter l'absorption intestinale des stérols neutres.

2.1.2.4 Export entérocytaire du cholestérol absorbé

2.1.2.4.1 Voie des chylomicrons

Cette voie est active en phase postprandiale. Ainsi, le cholestérol capté au sein de l'entérocyte est estérifié par l'action d'une enzyme spécifique du réticulum endoplasmique (RE) : l'Acyl-CoA : Cholesterol Acyltransferase 2 (ACAT2) [83]. Une fois estérifié, le cholestérol s'associe à l'ApoB48. L'ApoB48 synthétisée au niveau du RE des entérocytes est indispensable à la formation et à l'assemblage des chylomicrons en devenir. Grâce à l'action de la protéine microsomale de transfert des TG (MTP), l'ApoB48 se charge majoritairement en TG, le CE hydrophobe migre alors au cœur de la particule [84]. En plus de l'ApoB48, les chylomicrons contiennent de l'ApoAI, AII et AIV nouvellement synthétisés dans la cellule. Les chylomicrons néoformés sont excrétés au niveau de la membrane basale des entérocytes. Dans la circulation, ils se chargent aussi en ApoC et E issu des HDL. Exclusivement synthétisés dans l'intestin, les chylomicrons sont d'abord sécrétés dans la lymphe mésentérique par exocytose puis, vont rejoindre la circulation sanguine via le canal thoracique au niveau de la veine sous clavière gauche (**figure 8**).

Lors de leur transit dans la circulation sanguine, les chylomicrons vont se lier à la Lipoprotéine Lipase (LPL). La LPL est une enzyme fixée à l'endothélium des vaisseaux sanguin et qui a une activité lipolytique [85]. Elle va permettre l'hydrolyse des TG par reconnaissance du cofacteur de la réaction : l'ApoCII. Des acides gras vont alors être libérés puis captés par les tissus. Mécaniquement, cette hydrolyse des TG va entraîner une diminution de taille de la particule. Certaines protéines de surface telles que l'ApoAI et l'ApoC, vont être libérées de la structure et contribueront à la formation de nouvelles particules de type HDL. L'hydrolyse des TG conduit à la formation de remnants de chylomicrons, proportionnellement moins chargés en TG et plus riches en CE.

Les remnants de chylomicrons peuvent être directement captés par certains tissus, sans être préalablement captés par le foie. C'est par exemple le cas pour le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux [86]. Mais, le reste des particules est majoritairement capté au niveau du foie par endocytose dépendante de la présence de récepteurs dédiés, puis catabolisé (**figure 9**). Ce captage se fait par reconnaissance de l'ApoE via deux récepteurs principaux : le récepteur au LDL (LDLR ou récepteur à l'ApoB/E) et le LDL receptor-related protein1 (LRP1). Ainsi, des mutations perte-de-fonction du LDLR chez l'homme entraînent une forte augmentation des particules à ApoB 100 mais pas de modification du captage des particules à ApoB 48/E [87]. Aussi, des souris déficientes en LRP1 spécifiquement dans le foie ne présentent pas de baisse du captage des remnants de chylomicrons [88]. Les auteurs montrent que ce résultat est dû à une augmentation de l'expression protéique du LDLR au niveau hépatique. Par contre, on constate chez des souris déficientes pour le LDLR que l'inactivation du LRP1 induit une forte accumulation des remnants de chylomicrons dans le compartiment plasmatique [88]. Les travaux de Rohlmann *et al.* mettent en évidence l'implication de ces deux transporteurs dans le captage des remnants de chylomicrons. Le LDLR et le LRP1 semblent donc avoir un rôle redondant dans le captage des remnants de chylomicrons. SRB1 semble également participer au captage des chylomicrons. En effet, chez la souris, la surexpression adénovirale de SRB1 dans le foie augmente le métabolisme des chylomicrons possiblement via la facilitation du captage des remnants de chylomicrons [89].

2.1.2.4.2 Voie des HDL

Des travaux publiés en 2005 ont mis en évidence l'existence d'une seconde voie de sécrétion du cholestérol absorbé, indépendante de l'ApoB48. In vitro, Iqbal *et al.* ont montré sur un modèle de cellules intestinales Caco-2 et sur des entérocytes primaires issus de souris déficientes en ApoA1 que le cholestérol peut être sécrété au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes vers des lipoprotéines à ApoA1 [90]. Sur les entérocytes primaires issus de souris déficientes en ApoA1, la sécrétion du cholestérol par les HDL, mais pas par la voie des chylomicrons, est fortement réduite. L'apport de l'ApoA1 dans le milieu extracellulaire permet de nouveau aux entérocytes d'effluer du cholestérol vers l'ApoA1. Iqbal *et al.* montrent également que l'ApoA1 semble jouer un rôle dans la cinétique d'absorption du cholestérol. Les souris déficientes en ApoA1 présentent une concentration plasmatique en HDL cholestérol fortement réduite par rapport à des souris contrôles et suite à un gavage avec du cholestérol radiomarqué, son absorption varie sur le court et le long terme [90]. Cette voie semblerait médiée par le transporteur ABCA1. En effet, des souris déficientes en ABCA1 spécifiquement au niveau intestinal présentent une diminution de 30% de la quantité de HDL plasmatique [91]. Ces résultats suggèrent donc la présence d'une voie intestinale différente de celle de l'ApoB48 dans l'efflux du cholestérol absorbé et qui passerait par l'ApoA1 et le transporteur ABCA1 (**figure 8**).

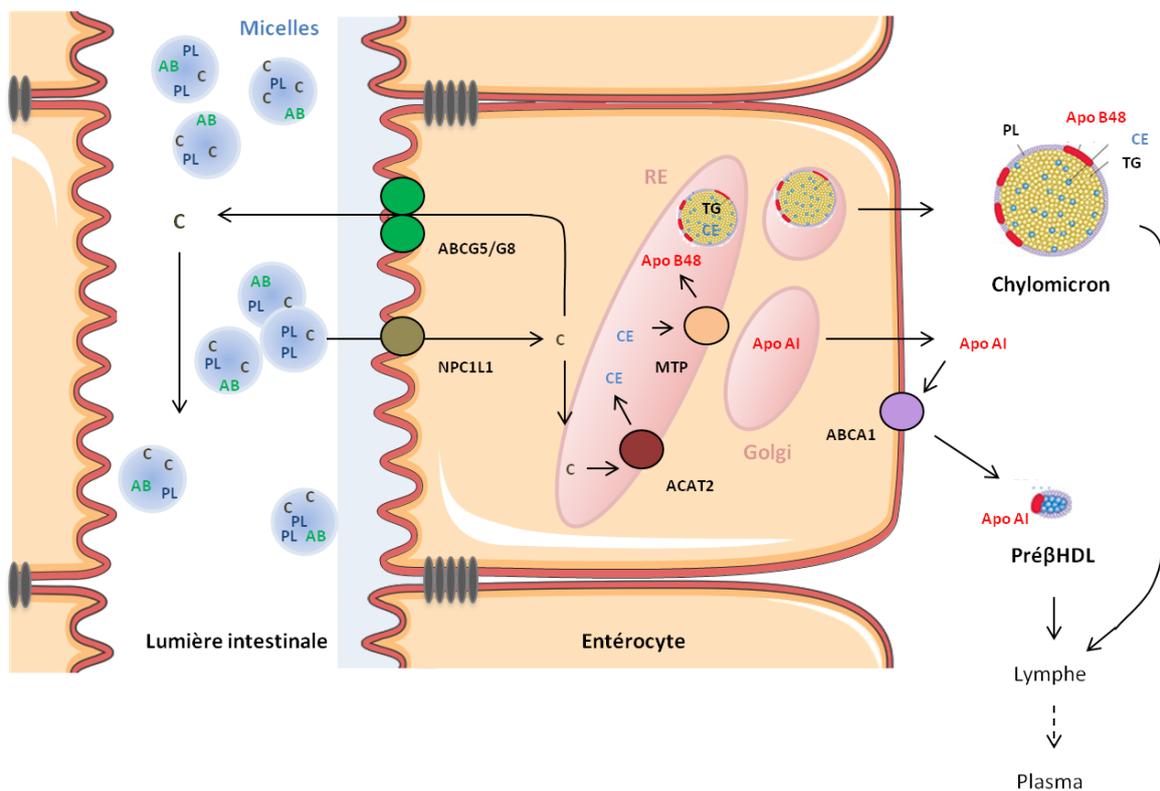


Figure 8. Représentation schématique de l'absorption entérocytaire et de l'excrétion lymphatique du cholestérol (d'après [92])

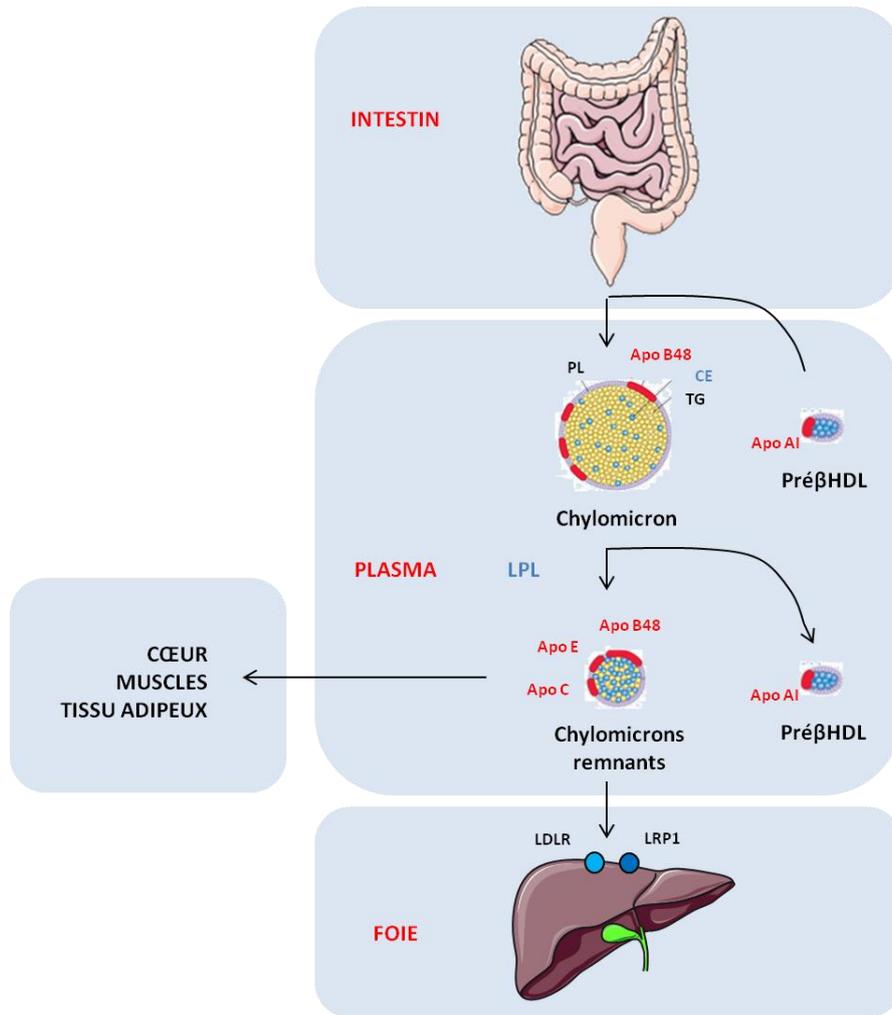


Figure 9. Représentation schématique de la voie entéro-hépatique du cholestérol

2.2 L'apport en cholestérol aux tissus

2.2.1 Libération hépatique, transit et remodelage vasculaire

Les VLDL produits par le foie et libérés dans la circulation sanguine sont à l'origine de cette deuxième voie (**figure 10**). Le cholestérol absorbé et néo-synthétisé par le foie est excrété au sein de ces lipoprotéines. Suite à l'action progressive des lipases plasmatiques sur les TG, les VLDL sont convertis en IDL puis en LDL. Par conséquent, les LDL sont les lipoprotéines les plus riches en cholestérol, elles transportent les 2/3 du cholestérol plasmatique. Ces particules proathérogènes sont éliminées de la circulation par leurs récepteurs (LDLR) au niveau du foie et des tissus périphériques.

L'assemblage des VLDL au niveau du RE comporte deux étapes. La première étape correspond à la lipidation de l'ApoB100. Des TG, qui sont les principaux constituants des VLDL et en moindre quantité du CE, vont s'agréger à l'ApoB100 qui est à l'origine de la formation de la lipoprotéine. Comme pour les chylomicrons, l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines à ApoB est médiée par l'action de protéines comme la MTP qui permet la maturation de la lipoprotéine dans le RE en se liant aux CE, PL et TG [93]. Les souris invalidées pour la MTP dans le foie ont une absence totale de lipoprotéines à ApoB100 et présentent une résistance à l'hypercholestérolémie induite par un régime riche en cholestérol [94], similaire au phénotype d'abetalipoprotéïnémie humaine. Dans une deuxième étape, les VLDL naissantes vont fusionner avec des gouttelettes riches en TG présentes dans la lumière du RE et dont la formation est également dépendante de la MTP [95]. Les VLDL matures ainsi formés vont acquérir d'autres apolipoprotéines que l'ApoB telles que de l'ApoC et de l'ApoE néo-synthétisées dans le foie.

Les VLDL néoformées quittent le RE vers l'appareil de Golgi via des vésicules COPII. Une fois dans l'appareil de Golgi, les VLDL sont rassemblées au sein de vésicules sécrétoires puis transportées à la membrane plasmique de l'hépatocyte et enfin libérées.

Dans la circulation sanguine, les TG vont subir une première hydrolyse sous l'action de la LPL endothéliale. Cette enzyme est activée par l'ApoCII qui est présente à la surface des VLDL. L'hydrolyse et la libération des TG conduit à une diminution de taille de la particule qui induit alors une perte de composés de surface tels que de l'ApoC et des PL. Les VLDL vont alors évoluer en IDL dû à ce remodelage mécanique. Les IDL sont donc plus petits et proportionnellement plus riche en ApoB100, en ApoE et en CE.

A leur tour, les IDL vont subir une hydrolyse sur les TG restants par l'action de deux enzymes, la Lipase Hépatique (HL) synthétisée et exprimée par le foie [96] et la Lipase Endothéliale (EL), conduisant à la formation de LDL.

Au stade LDL, la particule est très riche en CE et ne possède plus que de l'ApoB100. Conjointement à cette étape, les VLDL et les LDL peuvent recevoir du CE issu de particules HDL par échange de TG [97]. Ce mécanisme est permis grâce à la Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP), protéine qui est présente chez l'homme mais absente chez la souris.

En fonction du besoin des cellules en cholestérol et en différents lipides, les lipoprotéines vont pouvoir être captées grâce à l'interaction apolipoprotéine – récepteur membranaire. Cette reconnaissance par les récepteurs cellulaires se fait principalement par l'ApoB100 pour les IDL, LDL et par l'ApoE pour les VLDL.

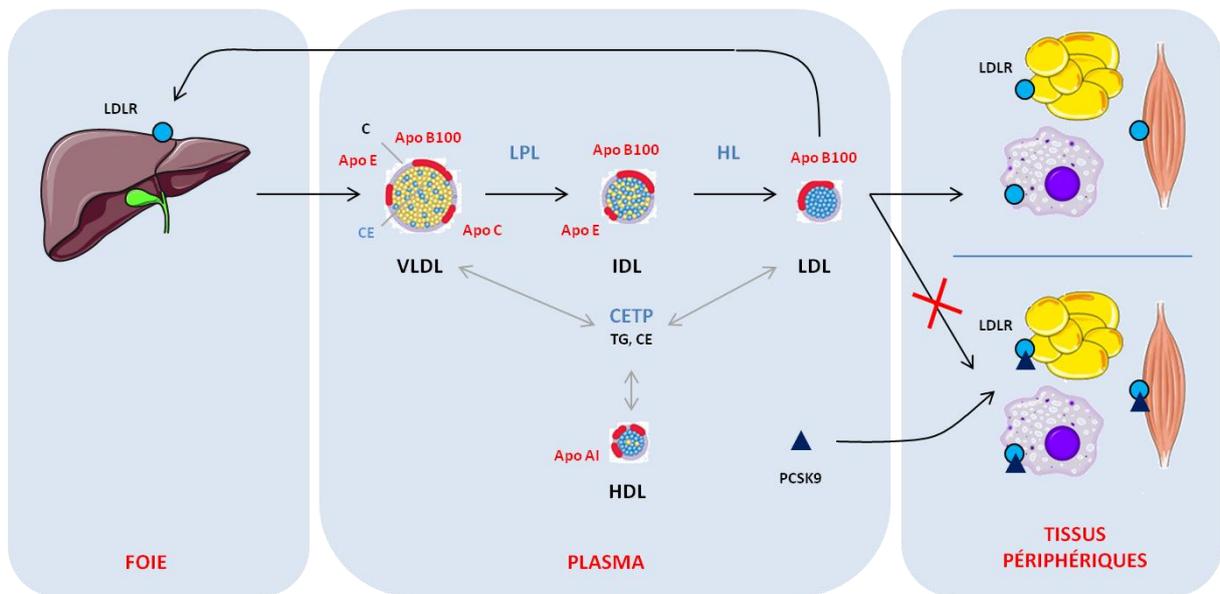


Figure 10. Représentation schématique de la voie endogène d'apport du cholestérol aux tissus

2.2.2 Captation du cholestérol : le LDLR

2.2.2.1 Identification et fonction

Le principal récepteur responsable de l'épuration plasmatique des LDL est le LDLR. Le gène du LDLR, situé sur le chromosome 19, code pour une protéine de 839 acides aminés et d'un poids moléculaire de 120 kDa. Chez l'homme et chez la souris, le LDLR est exprimé dans de nombreux tissus [98][99]. Chez les rongeurs, il est plus particulièrement exprimé dans le foie et dans l'intestin grêle [98]. Au cours de sa maturation vers la membrane plasmique, le LDLR subit une glycosylation aboutissant à la forme mature de la protéine d'un poids moléculaire de 160 kDa. Brièvement, le LDLR est une glycoprotéine transmembranaire composée de 5 domaines :

- un domaine cytoplasmique de petite taille nécessaire pour diriger le LDLR aux puits recouverts de clathrine
- un domaine transmembranaire
- un domaine de liaison aux sucres
- un domaine possédant 35% d'homologie avec l'EGFP (Epidermal Growth Factor Precursor) qui est composé de 3 sous-domaines (EGF-like A, B, C) et qui pourrait être impliqué dans la dissociation et le recyclage du LDLR
- un domaine de liaison aux lipoprotéines *via* leurs apolipoprotéines.

Le LDLR est aussi appelé récepteur à l'ApoB100/E car il est capable de reconnaître et de se lier aux lipoprotéines contenant de l'ApoB100 [100] et / ou de l'ApoE [101]. A la membrane plasmique, le LDLR est localisé au niveau de zones enrichies en clathrine [102]. Une mutation du gène codant le LDLR peut entraîner le développement d'une hypercholestérolémie familiale (HF) via un défaut de clairance du LDL cholestérol. L'HF

est une affection génétique fréquente touchant un individu sur 500 dans sa forme hétérozygote. Elle se transmet sur un mode autosomique dominant et se manifeste par une élévation de la quantité plasmatique de LDL cholestérol, responsable de la survenue précoce de complications CV.

Les LDL vont être endocytées puis catabolisées dans les cellules des tissus périphériques selon un processus en plusieurs étapes [103]. Les LDL circulantes se fixent au domaine de liaison extracellulaire du LDLR. Le complexe LDLR-LDL est alors internalisé par endocytose au niveau des puits recouverts de clathrine. Au cours de l'acidification de l'endosome via l'ATPase de type V, le complexe LDLR - lipoprotéine se dissocie. En effet, l'acidification du pH induit un changement conformationnel du LDLR. Ainsi, à pH neutre, le LDLR adopte une conformation ouverte linéaire au niveau de son domaine de liaison aux lipoprotéines. A pH acide dans les endosomes, le LDLR libère la lipoprotéine et prend une conformation fermée (**figure 11**). Le LDLR peut alors être recyclé et redirigé à la surface cellulaire via une vésicule endosomale. Il pourra de nouveau se lier aux particules de LDL pour environ 150 cycles [104]. La lipoprotéine est quant à elle dégradée dans le lysosome (**figure 12**). Les différents constituants protéiques et lipidiques de la LDL sont remobilisés par la cellule pour combler ses besoins, notamment en cholestérol. Le LDLR est le seul récepteur capable de reconnaître et d'endocyter les LDL *via* l'ApoB100.

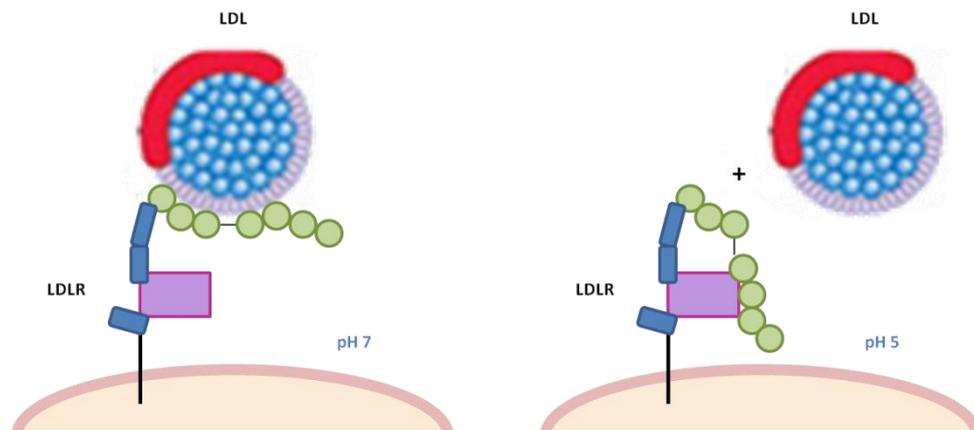


Figure 11. Changement de conformation du LDLR en fonction du pH [102]

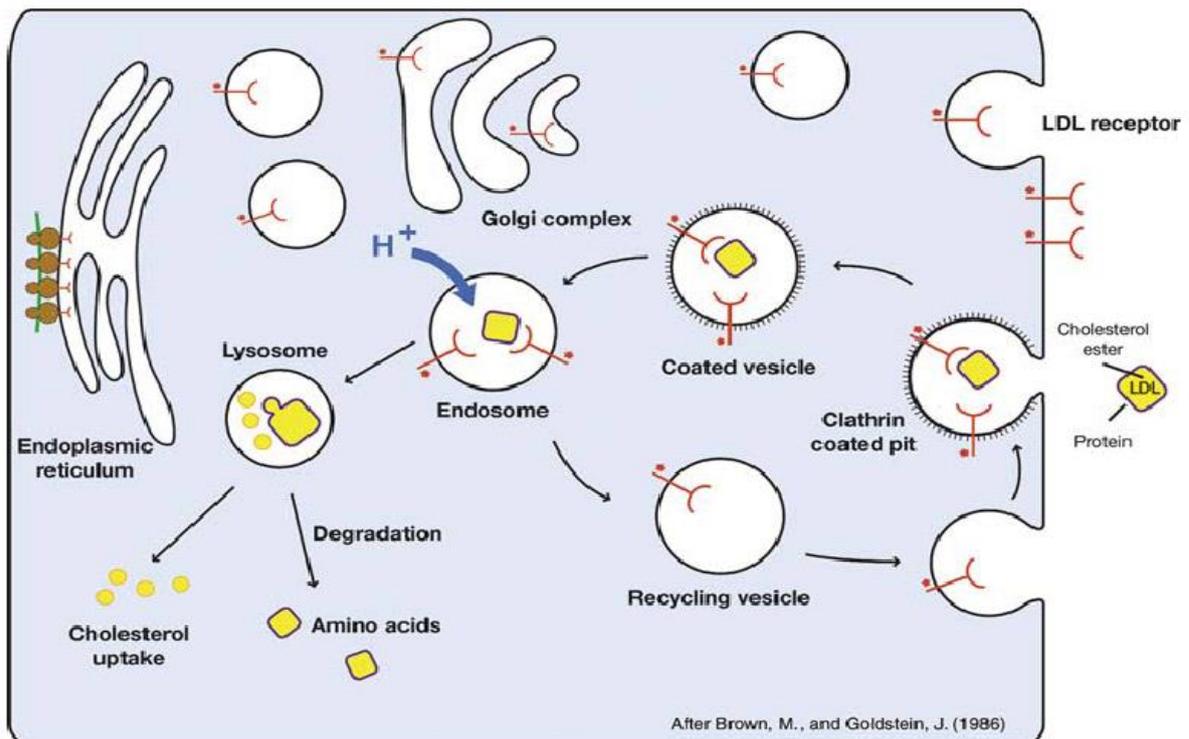


Figure 12. Endocytose et recyclage du LDLR à la membrane plasmique [102]

2.2.2.2 Régulation du LDLR et de la captation du LDL-cholestérol

Le LDLR a rôle central dans le métabolisme du cholestérol. En effet, il joue un rôle d'intermédiaire entre le cholestérol extracellulaire plasmatique et le cholestérol intracellulaire. Il capte le LDL cholestérol par reconnaissance de l'ApoB100 présente sur les LDL et favorise son catabolisme au niveau du foie. Il fait donc l'objet d'une fine régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.

Le contenu intracellulaire en cholestérol libre impacte l'expression du LDLR. En effet, l'activation de SREBP2 est dépendante du niveau de cholestérol libre présent dans la cellule. Ainsi, suite au captage ou à la synthèse de cholestérol libre ou suite à l'hydrolyse de cholestérol estérifié capté ou stocké par la cellule, le cholestérol libre peut rejoindre les membranes plasmiques et le RE [15]. L'enrichissement du RE en cholestérol libre va alors induire le maintien de SREBP2 à sa membrane, empêchant la transcription du LDLR. Inversement, en cas de baisse du contenu cellulaire en cholestérol libre, SREBP2 active la transcription du LDLR (Cf. § 2.1.1.1).

Comme vu précédemment, les statines vont induire une augmentation de l'expression du LDLR via l'activation de SREBP2 suite à l'inhibition de l'HMG-CoA réductase [12].

De plus, le cholestérol active l'Acyl cholesterol acyl transferase 2 (ACAT2) qui permet son estérification au sein de la cellule : ACAT2, par son activité combinée sur le cholestérol des membranes des organites intracellulaires et l'oléyl-CoA du cytoplasme, permet la synthèse d'oléate de cholestérol (cholestérol estérifié).

Ce procédé permet de stocker l'excès de cholestérol sous forme de CE et d'inhiber la synthèse du LDLR, protégeant ainsi la cellule d'une entrée trop importante.

2.2.2.2.1 IDOL

Un autre mécanisme régulant le nombre de LDLR à la surface cellulaire pourrait potentiellement être une nouvelle cible thérapeutique pour réguler la cholestérolémie. Il s'agit de l'axe LXR - IDOL (Inducible degrader of the LDLR) - LDLR. IDOL a été identifié comme un des loci les plus fortement associés à l'hypercholestérolémie et aux maladies CV dans les analyses de GWAS (Genome wide association study) [105]. IDOL est une E3 ubiquitine ligase qui régule le LDLR de façon post-transcriptionnelle. Cette petite protéine induit l'ubiquitination et la dégradation du LDLR en réponse à une activation de LXR qui induit son expression. En effet, en cas d'augmentation intracellulaire de cholestérol, LXR va se lier à RXR et induire la transcription de ses gènes cibles, dont IDOL [106]. L'expression de l'ARNm d'IDOL est induite par des agonistes de LXR dans plusieurs types de cellules *in vitro* et dans de nombreux tissus *in vivo*, dont l'intestin. Le VLDLR et l'ApoER2, deux récepteurs de la famille du LDLR, sont aussi des cibles de dégradation pour IDOL [107]. Chez des souris surexprimant IDOL, on observe une augmentation de la quantité plasmatique de LDL-cholestérol. *In vivo*, la surexpression adénovirale d'IDOL ou un traitement avec un agoniste de LXR induit une diminution de la quantité de LDLR [108].

2.2.2.2.2 PCSK9

Il y a une dizaine d'années, l'identification d'un nouveau locus chez des familles d'HF nantaises ne présentant pas de mutations des gènes codant le LDLR ou l'ApoB a permis de localiser le locus situé en 1p34.1-p32 de cette 3^{ème} forme d'hypercholestérolémie familiale dominante (ADH) [109]. En 2003, l'équipe de C. Boileau à Paris et celle de N. Seidah à Montréal identifient le gène codant PCSK9 comme responsable de l'ADH chez ces patients [110][111]. *PCSK9* est un gène de 22 kb localisé sur le chromosome 1 et comprenant 12 exons. Ce gène code la Proprotéin convertase subtilisin/kexin type 9 ou PCSK9, 9^{ème} membre de la famille des proprotéines convertases. Son ARNm est retrouvé de façon ubiquitaire dans l'organisme, avec une expression plus importante au niveau hépatique, intestinal et rénal [110]. En un peu plus d'une dizaine d'années, de la découverte du gène à sa modulation en thérapeutique humaine, PCSK9 s'est imposée comme un acteur essentiel de la régulation de l'homéostasie du cholestérol.

Mutations de PCSK9

On distingue deux grands groupes de mutations : les mutations gain-de-fonction et les mutations perte-de-fonction de PCSK9, qui peuvent induire soit une hyper soit une hypocholestérolémie.

En 2003, les premières mutations à avoir été découvertes sur le gène *PCSK9* ont été des mutations gain-de-fonction [110]. Ces mutations étaient associées à des hypercholestérolémies familiales induisant un risque CV élevé. De nombreuses mutations gain-de-fonction, touchant différents sites sur le gène, ont ensuite été rapportées dans la littérature. Des études cliniques de divers mutants gain-de-fonction de PCSK9 montrent une augmentation du risque CV lié à l'athérosclérose chez certains de ces patients [112]. Le point commun de ces mutations est que ce sont des mutations faux-sens. Les effets de ces mutations sur la fonction de PCSK9 sont donc difficiles à appréhender contrairement aux mutations non-sens qui induisent des pertes de fonction. Les mutations gain-de-fonction de PCSK9 représentent moins de 1% des mutations responsables des HF contre 70% pour le LDLR [113].

Quelques années plus tard, l'étude ARIC (atherosclerosis risk in communities) a permis d'identifier des mutations perte-de-fonction de PCSK9 associées à des taux très faibles de LDL cholestérol chez certains individus de la population afro-américaine [114]. Ces mutations non-sens sont à l'origine d'une protéine tronquée affectant 1 afro-américain sur 40. Les variants non-sens s'accompagnent d'une valeur moyenne de LDL cholestérol abaissée de 28% et d'un risque CV diminué de 88% sur une période de 15 ans [114]. Sur d'autres paramètres CV, l'étude montre qu'il y a moins d'hypertendus dans la population présentant des mutations perte-de-fonction que dans la population afro-américaine non mutée pour PCSK9. Dans cette étude, d'autres mutations perte-de-fonction ont été identifiées (notamment un variant faux-sens affectant 1 caucasien sur 30), toutes corrélées à un taux bas de LDL-cholestérol.

Structure

Chez l'homme, PCSK9 est synthétisée sous la forme d'une proprotéine soluble (pro-PCSK9) de 662 acides aminés. Ce précurseur de 74 kDa est composé de 3 domaines : un prodomaine, un domaine catalytique et un domaine C-terminal. Il subit un autoclivage catalytique dans le réticulum endoplasmique pour libérer un fragment de 60 kDa (540 aa) et son prodomaine de 14 kDa (**Figure 13**). PCSK9 est ainsi excrétée de la cellule sous sa forme active [111]. Le prodomaine libéré reste lié de façon non covalente à l'enzyme et agirait comme un inhibiteur du domaine catalytique en bloquant son accès [115] (**Figure 14**). A l'heure actuelle, il n'a été découvert aucun autre substrat à PCSK9 que lui-même. L'activité catalytique de PCSK9 se limite donc à son propre clivage.

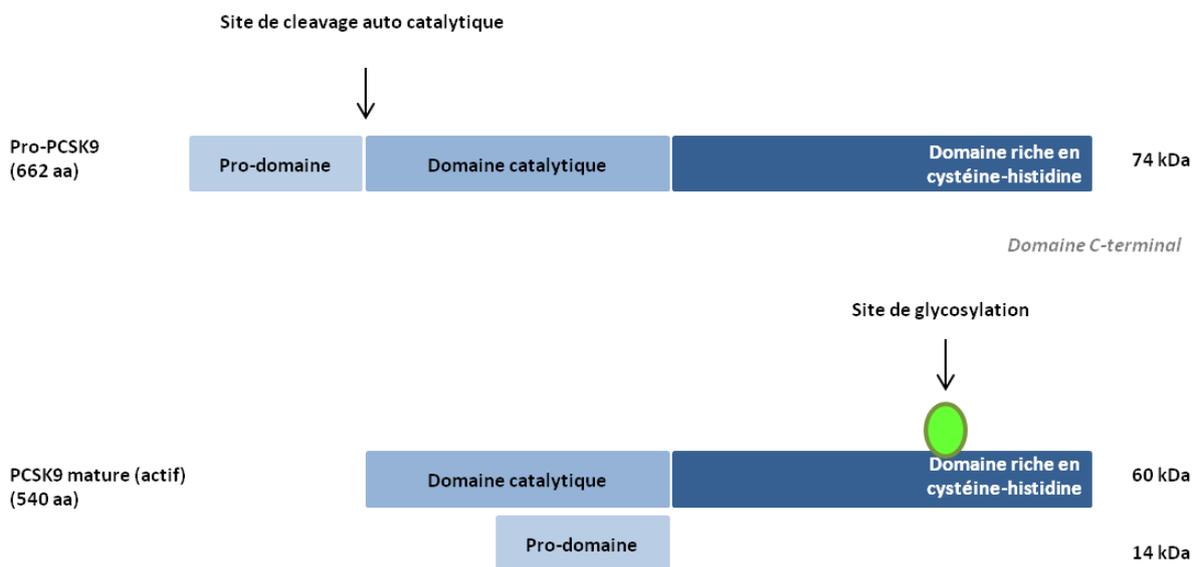


Figure 13. Schéma illustrant les étapes de maturation de PCSK9

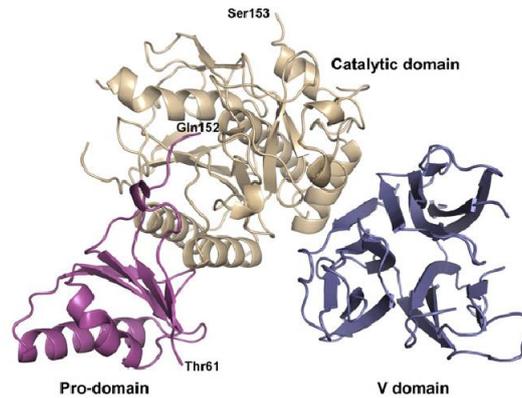


Figure 14. Structure cristallographique de PCSK9

Transport et sécrétion cellulaire de PCSK9

Comme de nombreuses protéines qui sont sécrétées, PCSK9 subit des modifications post-transcriptionnelles tels qu'une glycosylation, une phosphorylation et des tyrosine sulfatations [116][117]. Chen *et al.* se sont focalisés sur le transport intracellulaire et la sécrétion de PCSK9 hors de la cellule productrice. Ils ont ainsi pu montrer que l'absence de Sec24A, qui intervient dans le transport intracellulaire de protéines, induisait une baisse du cholestérol plasmatique via une diminution de la sécrétion de PCSK9 [118].

Les souris déficientes en Sec24A présentent une accumulation intracellulaire de PCSK9, un niveau accru de LDLR au niveau hépatique et une hypocholestérolémie caractérisée par une quantité réduite de LDL plasmatique. Inversement, la surexpression de Sec24A stimule la sécrétion de PCSK9 [118].

Le mécanisme moléculaire mis en jeu est le suivant : la protéine PCSK9 néo-synthétisée subit un autoclivage dans la lumière du RE. Le prodomaine libéré reste associé à la protéine mature qui est ensuite exportée vers l'appareil de Golgi. Ceci est permis grâce à l'association de PCSK9 au domaine luminal d'un récepteur transmembranaire du RE. Le complexe hétérodimérique Sec23-Sec24A, présent dans le cytosol se lie alors au niveau du domaine cytosolique du récepteur. Sec24A permet l'emballage de la protéine afin de pouvoir être transportée. Cette interaction au sein du cytosol est possible grâce à une ou plusieurs zones de liaison de Sec24A au domaine cytosolique du récepteur transmembranaire liant PCSK9. L'enzyme Sar1 est le quatrième acteur indispensable à la formation de la vésicule de transport issue de la membrane du RE. Le complexe PCSK9 mature/récepteur transmembranaire/Sec24A-Sec23-Sar1-GTP une fois formé est alors transporté au Golgi via des vésicules COPII-coated. PCSK9 est ainsi prêt à être sécrété hors de la cellule (**figure 15**).

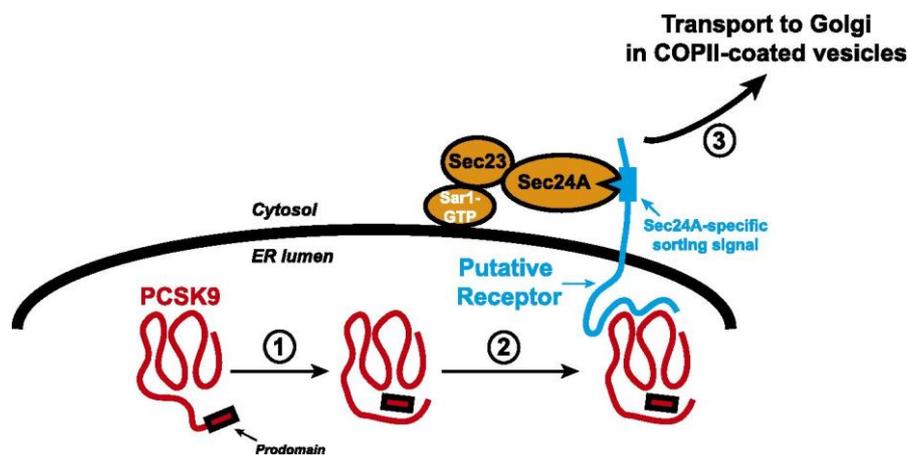


Figure 15. Transport de PCSK9 du RE vers l'appareil de Golgi [119]

Le foie est l'organe principal de sécrétion de PCSK9 chez la souris [120]. PCSK9 est détecté par immunoprécipitation dans le plasma des souris sauvages alors qu'aucun signal n'est détecté chez des souris invalidées pour PCSK9 dans le foie. Les souris déficientes totales en PCSK9 ou spécifiquement au niveau hépatique présentent respectivement une diminution de la cholestérolémie de 42% et 27% [120]. Le foie intervient pour les 2/3 dans le phénotype hypocholestérolémiant des souris déficientes en PCSK9 suggérant un rôle des tissus extra-hépatiques soit via une action paracrine de PCSK9 dans d'autres tissus dont l'intestin soit via la persistance d'une sécrétion extra-hépatique de PCSK9.

PCSK9, une protéine circulante

PCSK9 est une protéine circulante [121] et peu être détectée dans le plasma humain. Chez l'homme, plus de 40% de PCSK9 plasmatique sembleraient être associées avec les LDL. L'association LDL-PCSK9 dans le compartiment plasmatique limiterait la capacité d'action de PCSK9 [122]. Sa liaison à d'autres types de lipoprotéines n'a cependant pas été reportée. PCSK9 peut être clivée par d'autres proprotéines convertases comme la furine [123][124]. La furine clive PCSK9 au niveau de son domaine catalytique, générant une protéine de 53 kDa. Deux formes de PCSK9 sont donc présentes dans le compartiment plasmatique : une forme intacte et une forme clivée par la furine. Lipari *et al.* ont montré chez la souris que la forme clivée de PCSK9 n'est pas associée à une perte de fonction de la protéine et que la concentration en LDL-cholestérol est contrôlée par les deux formes circulantes de PCSK9 [123].

Fan *et al.* ont montré que PCSK9 peut également être retrouvée dans le plasma sous forme homodimerique ou même homotrimerique en fonction des paramètres physico-chimiques du milieu [125], modifiant ainsi son activité de dégradation du LDLR.

Grâce à l'utilisation de PCSK9 recombinante, des études de cinétique chez la souris ont montré que PCSK9 a une durée de vie courte dans le plasma - de l'ordre de 5 minutes. De même, il a pu être mis en évidence que 90% de la protéine circulante est éliminée par le foie dans les 15 minutes suivant une injection en intraveineuse de PCSK9 purifiée à une dose physiologique [126].

Les niveaux circulants de PCSK9 dans le plasma sont très variables chez l'Homme et la souris. Chez l'Homme, les niveaux circulants peuvent varier de 30 à 3000 ng/ml avec une médiane à 500 ng/ml (Dallas Heart Study [127]). La variabilité des anticorps utilisés pour la détection de PCSK9 circulante par dosage ELISA mais aussi, la forme de PCSK9 dans le plasma peuvent en partie expliquer cette importante variabilité [113]. Néanmoins, de nombreuses études ont montré que les niveaux plasmatiques de PCSK9 corrélaient avec les concentrations plasmatiques en cholestérol total et notamment le LDL-cholestérol chez l'homme [128][129]. La PCSK9 circulante corrèle également avec de nombreux autres paramètres dont le HDL-cholestérol, l'ApoB, le FCR (Fractional Catabolic Rate) de l'ApoB, la triglycéridémie, l'IMC (Indice de Masse Corporelle), la glycémie, l'insulinémie, le diabète, l'âge ou encore la ménopause (pour revue : [113]). Récemment, des membres de mon équipe ont montré que PCSK9 plasmatique est un biomarqueur tardif de sévérité chez des patients souffrant de graves lésions traumatiques [130]. PCSK9 est ainsi augmentée au cours du stress en réanimation.

PCSK9, inhibiteur post-transcriptionnel du LDLR

A la surface membranaire de la cellule, PCSK9 se lie au domaine extracellulaire EGF-A du LDLR [12]. L'étude cristallographique comparée de PCSK9 et LDLR EGF-A montre que la zone de liaison de PCSK9 au LDLR EGF-A est distante de son site catalytique [131]. Aussi, dans les cellules HepG2, la surexpression d'un variant de PCSK9 ayant un site catalytique inactif n'a pas d'effet sur le LDLR [132]. Cependant, une fois PCSK9 clivée, l'activité catalytique n'est pas nécessaire pour permettre sa liaison au LDLR [133]. PCSK9 n'a donc pas d'activité protéolytique sur le LDLR, elle agit comme une protéine chaperonne. Le complexe PCSK9 / LDLR / lipoprotéine est endocyté puis subit une dégradation lysosomale. Ainsi, PCSK9 diminue le recyclage du LDLR à la surface de la cellule et conduit à sa dégradation lysosomale [131] (**figure 16**). Il faut remarquer que la plupart des interactions PCSK9 / LDLR s'effectue avec la forme mature du récepteur [132].

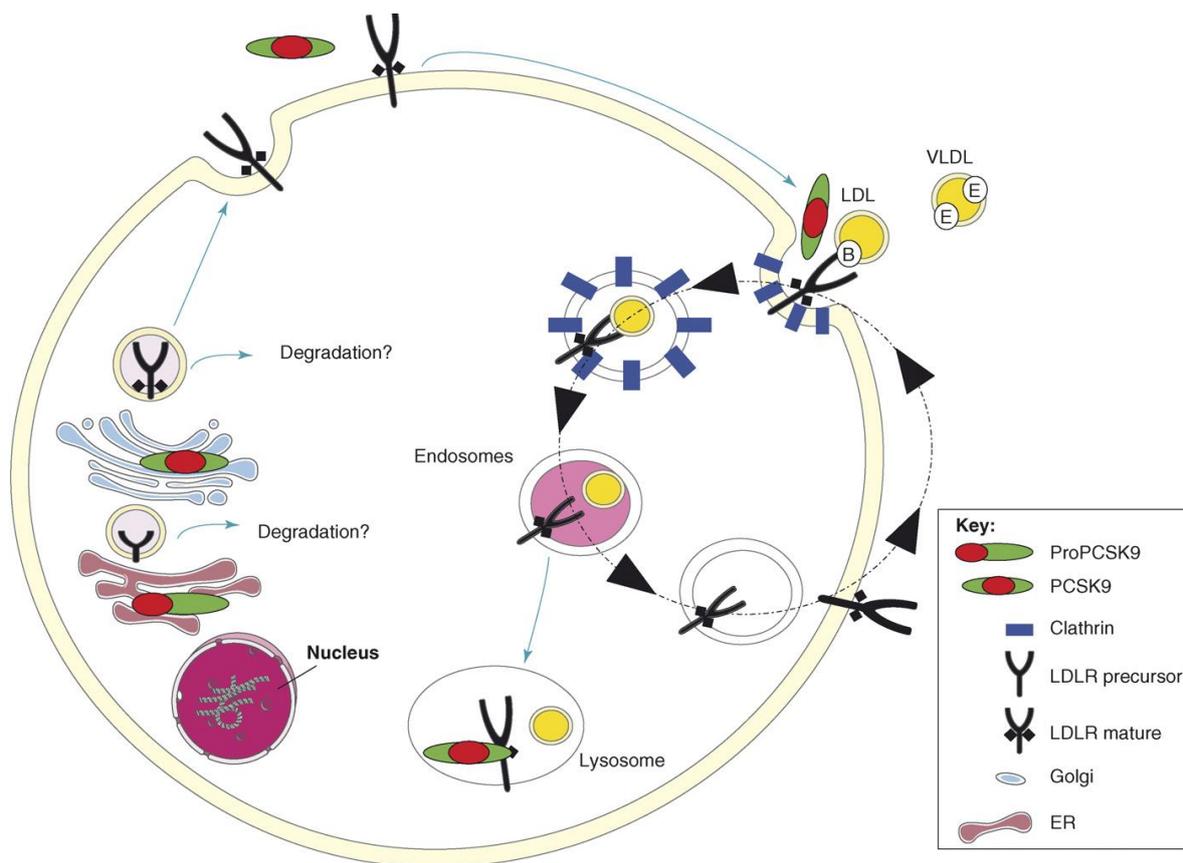


Figure 16. Effets de PCSK9 sur le LDLR [12]

Différentes études montrent un lien entre PCSK9 et les niveaux d'expression du LDLR hépatique. Ainsi, chez les patients porteurs de la mutation S127R hypercholestérolémiant gain-de-fonction de PCSK9, on constate une diminution de 35% du nombre de LDLR à la surface de lymphocytes immortalisés [116]. A l'inverse, la quantité de LDLR à la surface des hépatocytes est augmentée de 2,8 fois chez les souris déficientes en PCSK9 [134].

PCSK9 agit sur le LDLR de manière post-transcriptionnelle : elle augmente la dégradation du récepteur sans en affecter l'expression. En effet, la surexpression adénovirale de PCSK9 chez la souris induit une augmentation du LDL cholestérol secondaire à une diminution de l'expression protéique du LDLR hépatique, sans modification de l'expression du gène codant le récepteur [132].

Le mécanisme d'action par lequel PCSK9 va moduler l'expression hépatique du LDLR n'est que partiellement connu. PCSK9 va pouvoir agir une fois le LDLR exprimé à la surface cellulaire cependant, on ne peut pas exclure un rôle intracellulaire de PCSK9. La part respective de chaque voie demeure encore inconnue bien que la voie extracellulaire soit la plus étudiée car la plus prometteuse en termes de stratégies thérapeutiques hypocholestérolémiantes [135]. La forme intracellulaire peut jouer un rôle dans la dégradation du LDLR ou de son précurseur. Par exemple, certaines mutations gain-de-fonction comme S127R induisent une hypercholestérolémie quand bien même la protéine PCSK9 modifiée n'est produite et sécrétée que très faiblement [136]. Une voie de dégradation intracellulaire du LDLR médiée par PCSK9 est donc possible.

Régulation de l'expression de PCSK9

Différents activateurs et répresseurs de l'expression de PCSK9 ont été identifiés (**figure 17**).

Le statut nutritionnel : le niveau d'expression de PCSK9 est fortement réduit par le jeûne chez la souris [137], chez le hamster [138] où l'on observe une augmentation de l'expression protéique du LDLR hépatique et une baisse de la concentration plasmatique du LDL cholestérol, et chez l'homme [139][140]. A l'inverse, en période postprandiale, l'expression de PCSK9 est augmentée en réponse à l'insuline via le facteur de transcription SREBP1c [141]. De façon contradictoire, un knockdown du récepteur à l'insuline par un shRNA chez la souris entraîne une augmentation de l'expression de PCSK9, corrélée à une baisse de l'expression hépatique du LDLR et de mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin 1), qui est une enzyme de la famille des sérine/thréonine kinases. De même, un traitement avec la rapamycine qui est l'inhibiteur de mTORC1 induit une augmentation de l'expression de PCSK9, une diminution de la quantité protéique du LDLR au niveau hépatique et une augmentation du LDL cholestérol chez des souris sauvages mais pas chez des souris invalidées pour PCSK9. Inversement, des souris dont l'activité hépatique de mTORC1 est augmentée présentent une diminution de l'expression de PCSK9 et une augmentation de l'expression protéique du LDLR au foie [142].

Un régime riche en graisse chez la souris induit une élévation de l'expression génique et protéique de PCSK9 au niveau hépatique [143]. Chez l'homme, les taux circulants de PCSK9 sont inchangés suite à un court régime gras et sont augmentés par un régime riche en fructose [144].

Le glucagon inhibe l'expression hépatique de PCSK9 chez le rat et augmente l'expression protéique du LDLR [145].

- *Le cholestérol* : PCSK9 est négativement régulée par le cholestérol. Un régime alimentaire riche en cholestérol réduit l'expression de PCSK9 chez la souris [146]. A contrario, la baisse de la concentration intracellulaire en cholestérol va induire l'activation de SREBP2 qui va entraîner une augmentation du niveau d'expression de PCSK9.
- *Le cycle circadien* : chez l'homme, la concentration plasmatique en PCSK9 est plus importante la nuit que le jour [140].
- *Les œstrogènes* : l'éthinylestradiol qui est un dérivé de l'œstradiol, réprime l'expression hépatique de PCSK9 chez le rat et augmente l'expression protéique du LDLR [145]. Chez la femme, de fortes doses d'œstrogènes dans le cadre d'une stimulation ovarienne pour infertilité induisent une baisse de la concentration plasmatique en PCSK9 et en LDL-cholestérol mais ne modifient pas la synthèse des acides biliaires [147].
- *Des composés pharmacologiques* : l'expression de PCSK9 est augmentée suite à un traitement aux statines via la voie SREBP2 [148], ce qui a pour effet de freiner l'efficacité du traitement dont les actions bénéfiques sont de diminuer la synthèse endogène du cholestérol et d'augmenter l'expression du LDLR. Chez l'homme, l'ézétimibe n'augmente pas les concentrations circulantes de PCSK9 [149]. L'effet des fibrates sur PCSK9 est contradictoire (Cf. § ci-dessous).

Aussi, la berberine, qui est une molécule hypocholestérolémiante naturelle extraite de plantes ainsi que l'oncostatine M qui est une cytokine, inhibent l'expression génique et protéique de PCSK9 *in vitro* dans des cellules HepG2 de façon dépendante du temps et de la dose [150][151].

- *Des récepteurs nucléaires* : PCSK9 est régulé par HNF1 α (Hepatocyte nuclear factor 1) qui est un facteur de transcription connu pour réguler plusieurs gènes cibles dans le foie et l'intestin liés notamment au métabolisme du cholestérol et des acides biliaires (pour revue [152]). En effet, l'expression du gène de PCSK9 est fortement induite par l'activation de HNF1 α chez le hamster [153] et inversement, elle est réduite suite à un traitement avec un siRNA dirigé contre HNF1 α dans des cellules HepG2 [154].

Le facteur de transcription FOXO3 et l'enzyme désacétylase SIRT6 régulent l'homéostasie du cholestérol via PCSK9. En effet, l'inactivation de SIRT6 dans le foie chez la souris conduit à une élévation de 45% de la concentration plasmatique en VLDL/LDL cholestérol liée à une augmentation de l'expression génique de PCSK9. Ainsi, SIRT6 est recruté par le facteur de transcription FOXO3 au niveau du promoteur du gène codant PCSK9, son activité enzymatique induit une désacétylation de l'histone H3 conduisant alors à l'inhibition de l'expression du gène. De plus, la surexpression de SIRT6 chez des souris nourries avec un régime gras réprime l'expression du gène codant PCSK9 et abaisse la concentration plasmatique en LDL cholestérol par rapport à des souris contrôles sous régime riche en gras [143].

Les agonistes de PPAR α répriment l'expression de PCSK9 *in vitro* [155]. Les fénofibrates, qui sont des agonistes synthétiques de PPAR α , diminuent ainsi de 50% l'expression hépatique de PCSK9 [156]. Ils vont aussi avoir pour effet de potentialiser l'effet des statines en réprimant l'induction de PCSK9 inhérent au traitement. Cependant, des données contradictoires indiquent que chez des patients diabétiques, les fénofibrates augmentent les concentrations plasmatiques de PCSK9 [157].

Duan *et al.* ont montré que l'activation de PPAR γ par l'administration de pioglitazone et du U0126 *in vitro* sur des cellules HepG2 et *in vivo* chez la souris augmente la synthèse hépatique de PCSK9 dans le foie ainsi que sa la concentration plasmatique. Ils mettent en évidence chez ces animaux une baisse de la concentration plasmatique en LDL cholestérol. Les auteurs montrent au niveau hépatique chez la souris que l'activation de PPAR γ induit l'expression protéique du LDLR et de la CYP7A1 qui est l'enzyme limitante de la synthèse des acides biliaires [158].

L'activation de LXR par les oxystérols ou des agonistes synthétiques, entraîne une augmentation de l'expression de PCSK9 via la voie SREBP1c. Ainsi, le T0901317 induit une élévation modérée de PCSK9 [146].

- *Des acides biliaires* : l'acide chénodésoxycholique, un des acides biliaires les plus abondants, réprime l'expression de PCSK9 sur des lignées d'hépatocytes humains potentiellement via l'activation du récepteur nucléaire FXR (Farnesoid X Receptor). En effet, le traitement par l'agoniste GW4064 sur le récepteur aux acides biliaires FXR diminue l'expression de PCSK9 [159].

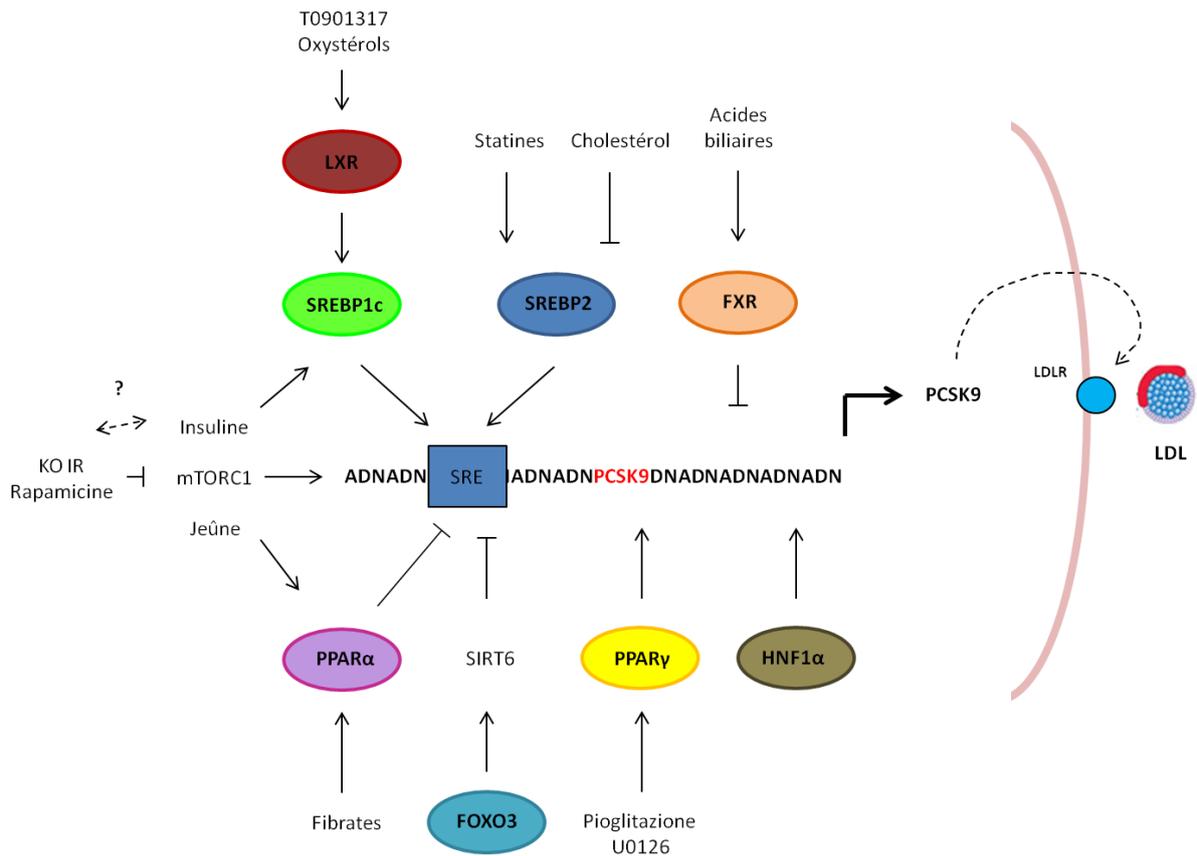


Figure 17. Régulation de l'expression de PCSK9

PCSK9 dans l'intestin

Des travaux menés au laboratoire par Cédric Le May sur le rôle de PCSK9 dans l'intestin montrent que l'ARNm de PCSK9 est fortement exprimé tout au long de l'intestin grêle et du colon chez la souris. Grâce à des biopsies intestinales humaines et à des cellules Caco-2, modèle entérocytaire colique humain, nous avons montré par des analyses immunohistochimiques que PCSK9 est exprimée au niveau de l'épithélium intestinal et semblerait principalement localisée au niveau du pôle apical des entérocytes [160]. Ce dernier résultat est différent de celui obtenu par Levy *et al.* qui, après quantification de PCSK9 sécrétée dans le milieu apical et basolatéral de cellules Caco-2, montrent que PCSK9 est principalement libérée à travers la membrane basolatérale [161]. C'est précisément la zone de la membrane entérocytaire où est exprimé le LDLR. Levy *et al.* montrent que PCSK9 sécrétée par les cellules Caco-2 est fonctionnelle et est sécrétée sous sa forme mature clivée de 65 kDa. L'ajout de PCSK9 recombinante dans le milieu de culture basolatéral des cellules Caco-2 a permis de mettre en évidence une baisse de l'expression du LDLR à la membrane. Chez la souris, Schmidt *et al.* montrent dans des conditions de surexpression adénovirale de la forme humaine de PCSK9 que l'expression du LDLR est fortement réduite dans le foie (-74%) mais aussi dans les organes extra-hépatiques tels que l'iléon (-33%) [162]. PCSK9 induit donc la dégradation du LDLR dans les entérocytes. De façon intéressante, notre équipe a mis en évidence

que les souris invalidées pour PCSK9 ont une expression protéique du LDLR augmentée de 300% dans l'intestin par rapport à des souris contrôles [160].

Nous avons pu montrer au laboratoire que les souris déficientes pour PCSK9 ont une triglycéridémie postprandiale fortement réduite deux heures après un gavage à l'huile d'olive par rapport aux souris sauvages, et ceci ne peut pas être expliqué par un défaut d'absorption ou de motilité intestinale. Suite à la cannulation du canal lymphatique, le dosage des TG directement sécrétés par l'intestin dans la lymphe ne montre pas de modification après gavage entre les souris sauvages et déficientes en PCSK9. Toutefois, il a été mis en évidence une diminution de la concentration en ApoB dans la lymphe des souris déficientes en PCSK9. *In vitro*, l'équipe a montré que la surexpression adénovirale de PCSK9 dans les cellules CaCo-2 augmente la sécrétion de l'ApoB et qu'inversement, son invalidation par des siRNA la diminue. De façon intéressante, l'analyse de la taille des chylomicrons sécrétés dans la lymphe au niveau intestinal indique une augmentation de 10% de leur diamètre chez les souris PCSK9 knock-out par rapport aux souris sauvages. Les souris déficientes en PCSK9 sécrètent donc moins de chylomicrons mais de plus grande taille et plus riches en TG. Le radio-marquage de ces particules montre qu'elles sont plus facilement catabolisées quand elles sont injectées chez des souris sauvages. De plus, les souris knock-out pour PCSK9 éliminent plus rapidement les chylomicrons issus de souris sauvages, vraisemblablement dû à une expression hépatique accrue du LDLR [160].

PCSK9, une nouvelle cible thérapeutique

L'étude des mutations gain- et perte-de-fonction de PCSK9 indique l'intérêt thérapeutique majeur que constitue l'inhibition de PCSK9 dans la prise en charge des hypercholestérolémies (Cf. § 2.2.2.2.2 point *Mutations de PCSK9*). En effet, la réduction de la mortalité associée aux mutations perte-de-fonction de PCSK9 est plus importante que celle observée lors d'essais utilisant des statines, traitement de référence de l'hypercholestérolémie [163]. Dans ce contexte, l'inhibition de PCSK9 semble extrêmement attractive. Deux classes d'inhibiteurs sont en cours d'évaluation clinique chez l'homme : les anticorps et les oligonucléotides.

PCSK9 peut être inhibée par des oligonucléotides antisens [164][165][166]. Dans des modèles animaux, ces molécules induisent la dégradation de l'ARNm de PCSK9, augmentant fortement la quantité de LDLR hépatique, corrélée à une baisse du LDL-cholestérol. Cependant, le développement de deux oligonucléotides antisens visant à réduire PCSK9 chez l'homme a récemment été stoppé pour cause de toxicité (notamment au niveau rénal [167]). Les ARN interférents (siRNA) sont actuellement toujours en cours de développement clinique.

Les anticorps monoclonaux humains dirigés contre PCSK9 semblent être la solution thérapeutique la plus prometteuse au vu des résultats des essais cliniques de phase I et II. Les anticorps monoclonaux ciblent la PCSK9 circulante afin d'empêcher son interaction avec le LDLR. Plusieurs études de phase II menées chez des patients hypercholestérolémiques, HF ou non, injectés avec l'anticorps anti-PCSK9 en monothérapie ou en association avec des statines, montrent une forte réduction de la quantité plasmatique du LDL cholestérol (comprise entre 50 et 70%) ainsi qu'une baisse inexplicée de la lipoprotéine (a) (Lp(a)) [168][169][170][171][172]. Les résultats obtenus permettent aux patients d'atteindre leur objectif thérapeutique et ne mettent pas en avant de problèmes de tolérance ou d'événements indésirables graves. Des essais cliniques de phase III, incluant plus de patients sur des périodes de traitement plus longues sont

actuellement en cours. L'objectif de ces études est de montrer que l'inhibition de PCSK9 via l'utilisation d'anticorps monoclonaux chez l'homme réduit ou retarde la survenue d'événements cardio-vasculaires. Ceci est d'autant plus intéressant dans un contexte où il a récemment été rapporté chez la souris un lien direct entre l'étendue des lésions athérosclérotiques et l'expression de PCSK9 [173].

2.2.3 Captation du cholestérol non dépendante du LDLR

Durant le remodelage des lipoprotéines à ApoB100 dans le compartiment plasmatique, les VLDL, IDL et LDL vont pouvoir être captées par les tissus via des récepteurs spécifiques, en plus du LDLR. Ainsi, les VLDL et les IDL, qui possèdent de l'ApoE, peuvent être captées par différents membres de la famille du récepteur au LDL :

- Le LRP1 (Low density lipoprotein receptor-Related Protein 1). Ce transporteur ubiquitaire est présent dans l'intestin et est fortement exprimé dans le foie et le cerveau [174]. Par sa capacité de liaison à l'ApoE [175], le LRP1 participe à l'endocytose des lipoprotéines riches en ApoE (chylomicrons, VLDL) [176][177]. De façon intéressante, Moon *et al.* montrent qu'un traitement avec des statines chez le rat induit une augmentation de l'expression hépatique du LDLR mais aussi du LRP1 via SREBP2 [178].
- Le récepteur des VLDL (VLDLR). Le VLDLR a une structure fortement similaire à celle du LDLR. Cependant, contrairement au LDLR, le VLDLR est peu exprimé au niveau du foie [179]. Il est néanmoins largement exprimé dans le tissu adipeux, les muscles squelettiques, le cœur et il est présent au sein de l'intestin grêle [180]. En effet, il est surtout impliqué dans le captage des lipoprotéines par les organes périphériques via la reconnaissance de l'ApoE. Le VLDLR module principalement le métabolisme extra-hépatique des lipoprotéines riches en TG. Il joue donc un rôle important dans le captage des chylomicrons et des VLDL en phase postprandiale. En effet, des souris déficientes en VLDLR présentent des concentrations plasmatiques en TG fortement élevées, en corrélation avec une réduction de 60% du captage des chylomicrons par rapport à des souris sauvages [181]. Son expression est directement régulée par le facteur de transcription PPAR γ mais également par le jeûne (pour revue [182]).
- Le récepteur à l'ApoE (ApoER2). L'ApoER2 ou LRP8 partage 50% d'homologie avec le VLDLR et est donc structurellement plus proche du VLDLR que du LDLR. Ce transporteur permet l'endocytose des lipoprotéines par reconnaissance de l'ApoE [182].
- La Megaline (LRP2). Ce récepteur permet l'endocytose des particules de LDL grâce à la reconnaissance de l'ApoB100 [183]. Il peut également lier l'ApoE. Ce transporteur est fortement exprimé dans les reins et les poumons (pour revue [86]). Des variations génétiques du LRP2 ont été associées avec une élévation des concentrations plasmatiques en cholestérol total et en LDL-cholestérol chez des patients dyslipidémiques [184].
- LRP6 (Low density lipoprotein receptor-Related Protein 1). Le LRP6 est un récepteur membranaire nécessaire au captage des LDL. Ainsi, une mutation perte-de-fonction sur ce gène entraîne une réduction de l'expression du transporteur à la membrane et du captage des LDL (pour revue [86]). Chez l'homme, des mutations perte-de-fonction de ce gène se caractérisent par une forme rare d'HF autosomique récessive.

De même, le cholestérol issu des particules à ApoB100 peut être capté par d'autres récepteurs, non liés à la famille du LDLR :

- La Sortiline, initialement identifiée dans les GWAS par sa corrélation négative avec le LDL-cholestérol [185], est un récepteur localisé principalement dans les endosomes précoces et dans le réseau trans-Golgien. Exprimée de façon ubiquitaire, elle lie de nombreux ligands pour leur trafic vers les lysosomes ou vers le réseau trans-Golgien [186][187]. La Sortiline est également exprimée à la membrane des cellules au niveau des puits recouverts de clathrine et constitue ainsi un point d'ancrage pour l'internalisation de différentes molécules. Musunuru *et al.* ont montré que l'augmentation de l'expression hépatique de la Sortiline chez la souris réduit la quantité plasmatique de LDL-cholestérol [188]. Récemment, la même équipe dirigée par J. Rader, a montré que la Sortiline régule au niveau hépatique la sécrétion d'ApoB et le catabolisme des LDL [189]. En effet, la surexpression de la Sortiline 1 chez la souris conduit à une diminution de la sécrétion de l'ApoB et une augmentation du catabolisme des LDL qui est corrélée à une réduction de la quantité circulante de LDL-cholestérol.
- SRB1 est un récepteur membranaire scavenger qui peut lier les particules de VLDL, IDL et LDL [190], bien que son rôle principal soit la captation des HDL au niveau du foie dans la voie du RCT.
- CD36 est une protéine qui fait partie de la famille des scavengers receptors et qui est exprimée dans de nombreuses cellules, notamment en quantité importante dans l'intestin [191]. Une étude montre dans des cellules COS-7 transfectées avec la forme humaine de CD36, que ce transporteur se lie à plusieurs lipoprotéines dont les LDL et VLDL, induisant une augmentation de la captation du cholestérol [192].

2.2.4 Régulation de la voie endogène d'apport

LXR et SREBP2 agissent de manière coordonnée pour maintenir l'homéostasie cellulaire et systémique du cholestérol. SREBP2 est activé en réponse à un faible niveau de cholestérol intracellulaire, alors que LXR est activé par un niveau élevé de cholestérol. Une des cibles majeures de la voie SREBP2 est le LDLR. Le captage des LDL bien que plus important dans le foie, se fait dans la plupart des cellules, y compris les macrophages. SREBP2 régule positivement la voie du LDLR tandis que LXR la régule négativement. En effet, LXR induit la transcription d'IDOL qui va induire une baisse de la captation des LDL par dégradation du LDLR. Le récepteur nucléaire LXR induit également l'expression d'un cluster de gènes codant pour des protéines de transport du cholestérol (ApoE, ApoC) [193] et de modulation de la composition des lipoprotéines (CETP, PhosphoLipids Transfert Protein PLTP, LPL) dans le compartiment vasculaire [194][195, p. 20][196].

Une étude très récemment publiée remet cependant en cause l'hypothèse selon laquelle la quantité de cholestérol qui entre dans la cellule via les LDL, s'intègre rapidement au pool de cholestérol intracellulaire et module l'homéostasie du cholestérol en inhibant la voie SREBP2 ; entraînant alors une réduction de la synthèse endogène du cholestérol et une baisse de la synthèse du LDLR. De façon intéressante, les auteurs de l'article relèvent que ce mécanisme a été validé via des études sur des fibroblastes en culture [197] mais pas dans des hépatocytes. Ainsi, Sniderman *et al.* montrent sur des hépatocytes primaires issu de hamsters que la synthèse endogène du cholestérol n'est pas significativement réduite suite au captage de particules de type LDL mais

que l'estérfication du cholestérol et l'expression de l'ACAT2 sont fortement augmentées par comparaison au LPDS (lipoprotein-deficient serum). A contrario, la synthèse du cholestérol est réduite avec des particules de type CM, remnants de CM, VLDL et HDL. De plus, il semblerait que le cholestérol ayant pour origine les LDL soit plus fortement sécrété par les VLDL que le cholestérol issu d'autres lipoprotéines. Finalement, Sniderman *et al.* suggèrent que le cholestérol qui est capté par les hépatocytes via les LDL est en grande partie shunté par la cellule et directement re-sécrété dans les VLDL sans affecter le mécanisme de régulation intracellulaire de l'homéostasie du cholestérol, suggérant l'existence d'un cycle futile [198].

Le facteur de transcription HNF4 (Hepatocyte nuclear factor 4) semble également contribuer à la régulation du métabolisme du cholestérol. Des souris déficientes en HNF4 spécifiquement dans le foie présentent un métabolisme du cholestérol altéré [199]. On observe notamment chez ces animaux une baisse de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse et le transport des VLDL tels que l'ApoB et la MTP. La délétion spécifique d'HNF4 au niveau hépatique induit aussi une baisse de la cholestérolémie corrélée à une baisse de la quantité plasmatique de HDL cholestérol et de l'expression de SRB1.

Le récepteur nucléaire FXR est un récepteur aux acides biliaires [200]. Lorsqu'il est activé, il stimule l'expression du LDLR et du VLDLR et inhibe celle de PCSK9 [201].

2.3 La voie classique du transport inverse du cholestérol (RCT)

La voie du RCT (**figure 18**) est cliniquement très importante car elle est antiathérogène contrairement à la voie endogène d'apport qui, en cas d'excès de cholestérol, est proathérogène [202]. Le RCT permet de prévenir l'accumulation du cholestérol dans les macrophages, réduisant alors le risque d'athérosclérose (pour revue [203]).

Classiquement, on divise le RCT en 4 étapes distinctes :

- l'efflux du cholestérol en excès présent dans les tissus périphériques vers l'ApoA1 libre ou les pré β HDL (particule discoïdale correspondant à de l'ApoA1 faiblement lipidée)
- la maturation et le remodelage vasculaire conduisant à la formation des HDL matures
- la captation des HDL par le foie
- l'élimination du cholestérol dans la bile soit sous forme libre, soit après conversion en acides biliaries

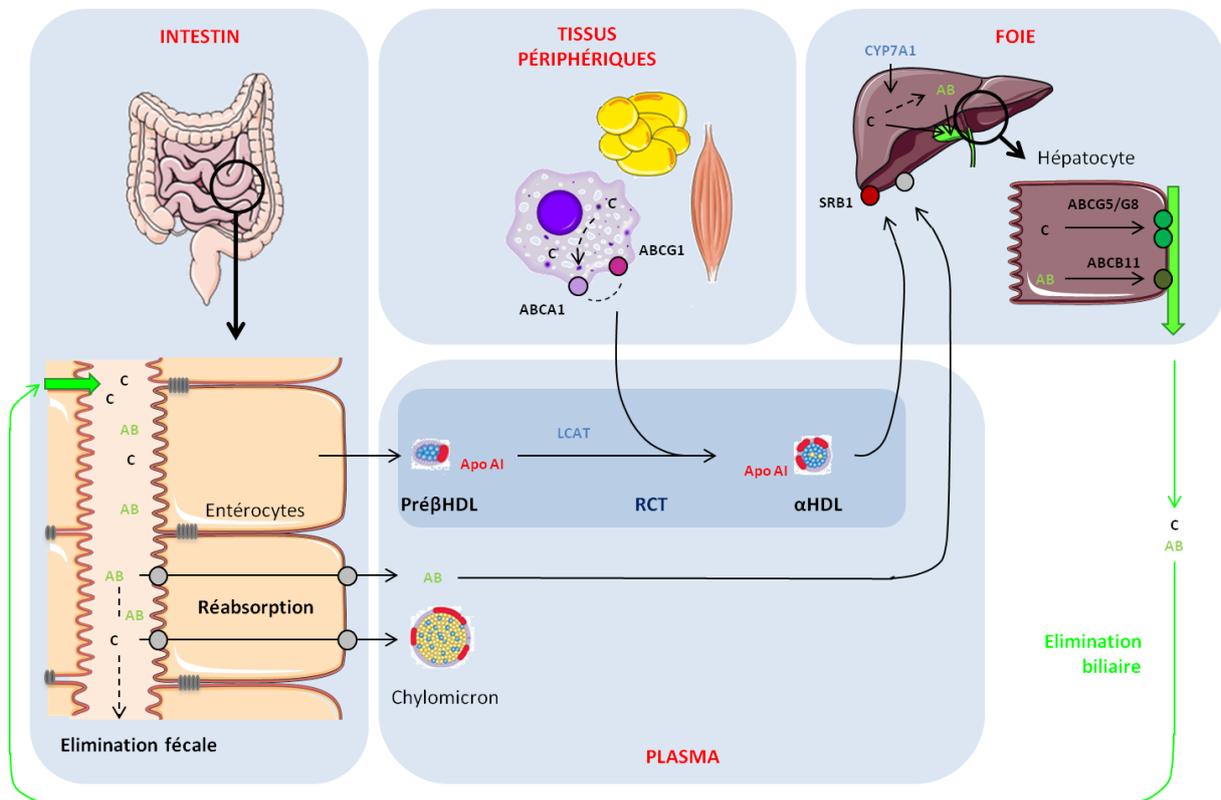


Figure 18. Représentation schématique de la voie classique du transport inverse du cholestérol (RCT)

2.3.1 Importance du RCT

Plusieurs grandes études populationnelles telles que la Framingham study ou l'AMORIS study ont montré une corrélation inverse entre la quantité plasmatique de HDL cholestérol / d'ApoA1 et le risque de maladie cardiovasculaire athéroscléreuse [204][205]. Les données ne sont cependant pas si simples et certaines méta-analyses ne retrouvent pas d'association forte entre des mutations affectant les HDL et le risque CV [21]. En

effet, dans les populations étudiées, certains patients présentent une quantité importante de HDL-cholestérol qui n'est pas pour autant reliée à une absence de maladies cardiovasculaires. Communément, l'effet cardioprotecteur des HDL est conféré à leur capacité d'efflux du cholestérol à partir des tissus périphériques et des macrophages, notamment présent au sein des plaques athéromateuses, vers le foie [206]. L'athérosclérose se caractérise par une accumulation de LDL riches en cholestérol au niveau des sites de prédisposition à la formation des plaques [207][208]. La modification de la structure, par oxydation des LDL retenues au niveau de la matrice extracellulaire conduit à l'internalisation des monocytes / macrophages du sang au sein de l'endothélium vasculaire. Ces cellules se transforment en cellules spumeuses suite au captage puis à l'accumulation intracellulaire des LDL oxydées [209]. Les HDL, par leur capacité d'efflux du cholestérol issu des macrophages sont donc des acteurs majeurs pour prévenir la progression mais aussi faire régresser les lésions athéromateuses. Dans ces conditions, le principal enjeu du RCT et de sa modulation pharmacologique est d'éliminer le cholestérol présent en excès dans l'organisme.

2.3.2 Acteurs du RCT

2.3.2.1 Les HDL

On distingue deux catégories de HDL : les préβHDL et les αHDL. L'ApoAI est leur principale apolipoprotéine et est essentielle pour leur biogénèse. Les préβHDL ou HDL naissantes sont principalement composées d'ApoAI et de quelques PL. Ils sont les accepteurs initiaux du cholestérol efflué par les cellules [210]. Leur forme est discoïdale, principalement à cause de l'absence de lipides neutres au cœur de la particule. Les HDL naissantes ne représentent qu'un faible pourcentage de la quantité des HDL totales, environ 5%. Les préβHDL peuvent avoir 3 origines :

- La synthèse directe par les cellules du foie ou de l'intestin
- Le recyclage des apolipoprotéines AI issues de particules HDL ayant subies un remodelage au cours de leur transit intravasculaire. Dans le plasma, deux particules αHDL peuvent fusionner conduisant à la formation simultanée d'une particule αHDL de grande taille et d'une particule préβHDL [211]. Les particules αHDL de grande taille sont intéressantes au niveau de la protection CV car elles permettent de ramener de plus grandes quantités d'esters de cholestérol au foie [211].
- L'hydrolyse des chylomicrons par la LPL entraînant une diminution de la taille de la lipoprotéine et donc une libération d'ApoAI.

2.3.2.2 Efflux du cholestérol macrophagique et transporteurs impliqués

Le cholestérol en excès dans les cellules des tissus périphériques est transféré vers les préβHDL. Il peut être transporté vers les HDL seulement sous la forme de cholestérol libre, pas sous la forme de cholestérol estérifié. Le cholestérol libre peut alors quitter la cellule par différentes voies qui peuvent être soit indépendante de la présence d'un transporteur (mécanisme passif) soit dépendante de la présence de transporteurs du cholestérol (mécanisme actif).

Le mécanisme actif d'efflux du cholestérol des tissus périphériques est dépendant de la présence des récepteurs ABCA1, ABCG1 et SRB1.

Les transporteurs ABC sont des régulateurs clés de l'efflux cellulaire du cholestérol, non seulement pour les macrophages mais pour tous les types cellulaires. Le transporteur ABCA1 permet de mobiliser le cholestérol libre et les PL vers la membrane plasmique et de favoriser leur captation au sein des préβHDL. Une modification de ce gène, qui est exprimé de façon ubiquitaire, peut entraîner un déficit sévère en HDL. C'est le cas pour les patients atteints de la maladie de Tangier [212] ou d'autres formes d'hypoalphalipoprotéinémie [213]. Cette protéine limitante a donc un rôle clé dans le maintien du niveau plasmique des HDL [214]. Des études faites sur des organes spécifiquement déficients pour ABCA1 ont montré que l'expression hépatique et intestinale d'ABCA1 sont des déterminants majeurs du taux de HDL chez la souris [91]. Une déficience spécifique d'ABCA1 dans les macrophages diminue fortement le flux de cholestérol radiomarqué, des macrophages vers le sérum et les fèces [215][216]. Néanmoins, l'inactivation d'ABCA1 au niveau des macrophages n'a que peu d'impact sur la quantité plasmique des HDL, suggérant qu'ABCA1 au niveau des macrophages ne contribue pas directement à la formation des HDL [217]. De façon générale, il est admis que l'ApoA1 est lipidée par ABCA1 pour générer des particules de HDL naissantes qui agissent alors ensuite comme des accepteurs du cholestérol, transporté depuis les cellules par ABCG1 [218].

Le transporteur ABCG1 est exprimé de façon ubiquitaire et notamment fortement au niveau des macrophages [219]. Le RCT à partir de macrophages est plus élevé chez des souris sauvages injectées avec des macrophages surexprimant ABCG1 et est fortement diminué lors de l'utilisation de macrophages qui n'expriment pas ABCG1 [215]. Contrairement à ABCA1, ABCG1 ne contribuerait pas à l'efflux du cholestérol et des PL vers les préβHDL mais vers des particules HDL plus matures de type αHDL. Kennedy *et al.* montrent *in vitro* à partir de macrophages péritonéaux que l'efflux du cholestérol radiomarqué est plus de 10 fois plus faible vers de l'ApoA1 libre que vers les HDL et que l'efflux du cholestérol radiomarqué à partir de macrophages péritonéaux invalidés pour ABCG1 vers les HDL est diminué [220]. Toujours au niveau macrophagique, ABCA1 et ABCG1 semblent fonctionner de concert dans le processus de RCT. En effet, le double knock-down d'ABCA1 et ABCG1 dans les macrophages réduit le RCT macrophagique bien plus drastiquement que le knock-down seul d'ABCA1 ou d'ABCG1 [221].

En plus d'ABCA1 et d'ABCG1, le cholestérol peut être efflué des macrophages vers les HDL via une voie dépendante de SRB1 [222]. Le récepteur SRB1 permet la liaison directe d'accepteurs lipoprotéiques à la membrane cellulaire [223] et est exprimé dans les macrophages. Ainsi, des macrophages surexprimant SRB1 ont un efflux du cholestérol vers les HDL augmenté par rapport à des cellules macrophagiques contrôles [224]. Cependant, l'importance de SRB1 dans l'efflux du cholestérol est à nuancer. Des souris injectées avec des macrophages dépourvus en SRB1 ont un niveau de cholestérol dans le sérum et dans les fèces similaire à des souris injectées avec des macrophages contrôles [215]. De plus, la double délétion d'ABCA1 et de SRB1 dans les macrophages ne modifie pas plus le RCT issu des macrophages que l'unique suppression d'ABCA1 [225]. Dans ce contexte, l'implication de SRB1 dans le RCT et l'efflux du cholestérol, notamment depuis les macrophages est toujours discuté.

L'ApoE semble être le quatrième acteur impactant le RCT. En effet, *in vitro*, des macrophages issus de souris déficientes pour l'ApoE ont un efflux de cholestérol vers les HDL ou l'ApoA1 libre diminué [226]. *In vivo*, des

souris sauvages injectées avec des macrophages n'exprimant pas l'ApoE présentent un RCT macrophagique diminué [227].

Enfin, l'efflux macrophagique du cholestérol pourrait faire intervenir le complexe F_0F_1 ATPase/P2Y₁₂. Ce complexe a été décrit en 2012 comme pouvant intervenir dans le passage de l'ApoAI et des HDL à travers des cellules endothéliales aortiques [228]. L'équipe de van Eckardstein avait précédemment mis en évidence que ABCA1 modulait le transport transendothélial de l'ApoAI [229] et que ABCG1 ainsi que SRB1 facilitaient le transport des HDL [230], qui sont les lipoprotéines les plus abondantes dans l'espace extravasculaire [231]. Les auteurs montrent ici que l'inhibition par un siRNA ou un peptide inhibiteur dirigé contre la F_0F_1 ATPase réduit aussi bien le transport transendothélial de l'ApoAI que celui des HDL. Le mécanisme d'action serait le suivant : suite à la reconnaissance de l'ApoAI libre dans le plasma, la F_0F_1 ATPase membranaire hydrolyse l'ATP en ADP. L'ADP va alors se lier à la protéine P2Y₁₂ permettant alors son activation qui va stimuler l'internalisation et le transport transendothélial des préβHDL et des HDL matures via l'activation de protéines G. L'internalisation des particules pourrait se faire via la liaison à SRB1, ABCG1 ou possiblement à d'autres transporteurs. Au niveau du foie, la F_0F_1 ATPase a également été caractérisée comme un récepteur à l'ApoAI, déclenchant l'endocytose des HDL [232].

2.3.2.3 Importance fonctionnelle du système lymphatique dans le RCT

Le système vasculaire lymphatique est indispensable pour le transport et l'absorption des lipoprotéines de grandes tailles riches en TG. Il assure un rôle de drainage des macromolécules de l'espace interstitiel vers la circulation sanguine, ainsi les lipoprotéines présentes dans l'espace interstitiel vont rejoindre le plasma via les vaisseaux lymphatiques plutôt que via les capillaires sanguins [233]. La lymphe est riche en cholestérol et notamment en HDL [231][234]. Selon les études, on retrouve +30% de HDL cholestérol en plus dans la lymphe par rapport au sang [231][235]. Des études expérimentales chez l'animal et cliniques chez l'homme ont établi un lien entre la fonction lymphatique, le transport et métabolisme du cholestérol [236]. Deux études très intéressantes, publiées cette année par Lim *et al.* dans *Cell Metabolism* et Martel *et al.* dans *JCI*, ont rapporté un rôle majeur de la circulation lymphatique dans l'efflux du HDL-cholestérol par le RCT [237][235]. Lim *et al.* ont utilisé un modèle de souris hypercholestérolémiques, les souris déficientes en ApoE, qui ont la particularité d'avoir une fonction lymphatique anormale entraînant une accumulation du cholestérol au niveau des tissus périphériques [238]. Chez ces souris, l'injection de macrophages chargés en cholestérol fluo-marqué dans la patte a permis de mettre en évidence, par une méthode adaptée de mesure du RCT *in vivo*, une baisse très nette du transport du cholestérol vers le plasma et vers le foie. Ces résultats, montrant une baisse drastique du RCT ont été retrouvés chez les souris transgéniques ApoA1 qui présentent un niveau élevé de HDL et les souris mutantes pour un allèle du récepteur à l'hormone de croissance vasculaire endothéliale (VEGFR3) qui présentent une absence de vasculature lymphatique spécifiquement au niveau la peau. Martel *et al.* montrent qu'une interruption chirurgicale du drainage lymphatique diminue fortement l'entrée des HDL marquées dans le sang. Lim *et al.* ont mis en évidence que ce phénomène faisait appel à un transport principalement actif des HDL à travers les cellules vasculaires endothéliales (LECs). SRB1, qui permet le captage sélectif du HDL cholestérol dans les hépatocytes, permet également le transport des HDL dans d'autres types cellulaires

comme les LECs. Suite à l'utilisation de différents inhibiteurs de SRB1 (siRNA, anticorps, inhibiteur chimique spécifique BL-T1), les auteurs ont mis en évidence qu'après l'injection de macrophages chargés en cholestérol fluo-marqué dans la patte, l'apparition du cholestérol marqué dans la lymphe puis le plasma était réduite. Ces résultats suggèrent que les vaisseaux lymphatiques ne sont pas uniquement des conduits fenêtrés poreux à pénétration passive, mais qu'ils fonctionnent aussi comme des médiateurs du transport des HDL de l'espace interstitiel vers la lymphe, régulant activement le RCT. Martel *et al.*, ont été plus loin en s'intéressant au lien entre la circulation lymphatique, le RCT et l'athérosclérose grâce à l'utilisation d'une méthode originale de transplantation de crosse aortique athérosclérotique sur des souris déficientes en ApoE puis traitées avec un anticorps anti-VEGFR3 permettant d'empêcher le rétablissement de la vasculature lymphatique. Après l'injection d'un vecteur adénoviral encodant l'ApoE qui permet de rétablir le profil lipoprotéique plasmatique chez ces souris, les auteurs ont ainsi pu montrer que le non rétablissement de la circulation lymphatique altère le RCT et provoque l'accumulation du cholestérol dans la crosse aortique transplantée. Malgré ce résultat important, les mécanismes du drainage lymphatique du cholestérol au sein des plaques d'athéromes ne sont pas rapportés au cours de l'évolution de la plaque.

En définitive, ces études indiquent clairement le rôle central des vaisseaux lymphatiques dans le retour du cholestérol issu des macrophages et des HDL de l'espace interstitiel vers la circulation, mettant en évidence leur importante contribution au RCT (**figure 19**). Ces travaux ouvrent un large champ de perspectives de recherche, entre autre pour évaluer l'importance quantitative de la part lymphatique du RCT notamment dans la lutte contre l'athérosclérose.

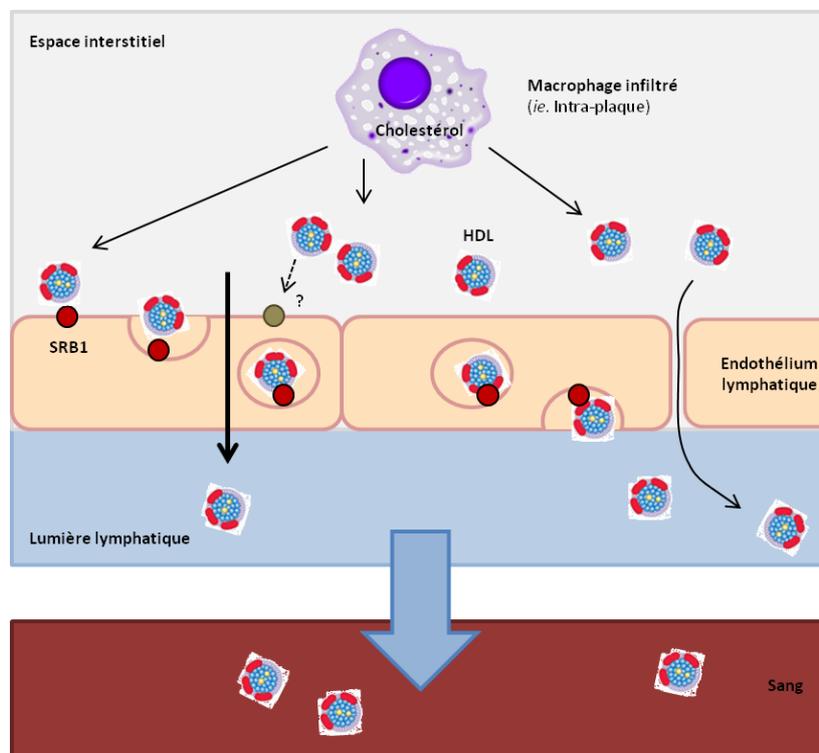


Figure 19. Rôle des vaisseaux lymphatiques dans le captage et le transport des HDL du liquide interstitiel

2.3.2.4 Protéines du compartiment vasculaire

Un déterminant de l'élimination du cholestérol des tissus périphériques et des macrophages est la quantité d'accepteurs susceptibles de le recevoir, principalement l'ApoAI et les HDL qui sont présents dans la circulation générale. L'ApoAI est une protéine non glycosylée de 28 kDa synthétisée dans le foie et l'intestin. Elle va subir différentes étapes de maturation au niveau intracellulaire et plasmatique avant de pouvoir être fonctionnelle. Elle est la principale apolipoprotéine des HDL et est indispensable à leur synthèse. Ainsi, des souris déficientes en ApoAI ont des quantités plasmatiques de HDL-cholestérol fortement réduites [239]. L'ApoAI est un acteur moléculaire important du RCT. La surexpression de la forme humaine de l'ApoAI chez la souris conduit à une augmentation de l'efflux du cholestérol des macrophages vers les fèces via la voie du RCT [240]. De façon intéressante, le RCT est augmenté chez des souris traitées avec des agents pharmacologiques mimant l'ApoAI tels que les peptides 5A et 4F [241][242].

Les HDL plasmatiques vont subir un remodelage dans le compartiment vasculaire via l'action de 5 enzymes principales : la lipase hépatique (HL), la lipase endothéliale (EL), la LCAT (Lecithin-Cholesterol Acyltransferase), la Phospholipid transfert protein (PLTP) et la Cholesterol ester transfert protein (CETP).

2.3.2.4.1 La HL et l'EL

Les lipases hépatique et endothéliale sont deux enzymes glycoprotéiques, respectivement de 65 et 68 kDa, qui régulent négativement le métabolisme des HDL [243]. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser des substrats hydrophobes comme les TG et les PL en se liant à tout type de lipoprotéines pour la HL et principalement aux HDL pour la EL [244]. La HL est sécrétée par le foie puis se lie à la surface des cellules endothéliales. La EL est quant à elle exprimée par les cellules endothéliales mais aussi par les hépatocytes et les macrophages [245]. Les souris déficientes en HL ou EL ou double knock-out HL / EL ont des niveaux de HDL cholestérol plus élevés que des souris contrôles mais présentent une diminution du captage du HDL cholestérol au niveau foie [243]. Chez ces animaux, le transport du cholestérol des macrophages vers les fèces reste inchangé [246]. In vitro, la HL permet d'augmenter le captage du CE des HDL via SRB1 [247]. L'inactivation de la EL induit une augmentation de la quantité plasmatique de HDL cholestérol dû à une baisse de l'épuration des HDL par le foie [248]. Ainsi, aussi bien pour la HL que la EL, il semble que la captation du HDL cholestérol plutôt que la quantité de HDL cholestérol plasmatique soit limitante pour le RCT.

2.3.2.4.2 La LCAT

La LCAT est une glycoprotéine enzymatique de 63 kDa principalement synthétisée par le foie et qui permet l'estérification du cholestérol libre [203]. L'ApoAI active la LCAT [249]. Son association avec les HDL circulantes, via son cofacteur l'ApoAI, est réversible. La LCAT agit par estérification du cholestérol libre qui se trouve à la surface de la lipoprotéine à partir du transfert d'un acide gras depuis la phosphatidylcholine ou la lécithine [250]. Le CE néo-synthétisé migre alors vers le cœur hydrophobe, au centre de la particule [250]. Cette internalisation du CE entraîne un changement d'aspect de la particule qui passe d'une conformation discoïdale à une forme α HDL, plus grande et sphérique. Ainsi, du fait de sa transformation et de la diminution du nombre de molécules amphiphiles au profit de molécules hydrophobes, l'action de la LCAT favorise le transfert du CL

des tissus périphériques vers la particule. Des souris déficientes pour la LCAT présentent de très faibles quantités de HDL plasmatiques bien que le RCT issu des macrophages n'est diminué que de 50% par rapport aux souris contrôles [251]. Outre son effet sur le HDL cholestérol, la surexpression de la LCAT chez le lapin entraîne une réduction du LDL-cholestérol [252]. Étonnamment, Alexander *et al.* montrent qu'il ne semblerait pas y avoir de corrélation entre la quantité de cholestérol estérifié par la LCAT et la quantité de cholestérol issu des macrophages retrouvée dans les fèces [253]. La LCAT semble donc importante pour maintenir le gradient de concentration entre la membrane cellulaire et la particule de HDL via l'estérification du cholestérol cependant, les données sur son importance dans le RCT macrophagique restent contradictoires.

2.3.2.4.3 La PLTP

La protéine de transfert des phospholipides est une autre enzyme importante du remodelage des HDL. Cette protéine de 81 kDa est présente dans le plasma aussi bien sous forme active qu'inactive. La forme active est associée aux lipoprotéines à ApoA1 tandis que la forme inactive est associée aux lipoprotéines contenant de l'ApoE [254]. La PLTP est exprimée de façon ubiquitaire et de manière importante dans le foie et l'intestin compte tenu de la taille de ces organes [255]. Il a également été démontré que la PLTP est fortement exprimée dans les macrophages [255]. Cette enzyme permet des échanges de PL des lipoprotéines riches en TG (CM, VLDL, IDL) vers les HDL [256]. L'activité de la PLTP résulte en la formation de HDL de grandes tailles conduisant à la libération d'ApoA1 faiblement lipidée [257][258]. Les souris surexprimant la forme humaine de la PLTP présentent des quantités de HDL plus faibles, une augmentation de leur capacité à générer des préβHDL et une augmentation de la susceptibilité à l'athérosclérose [259]. De plus, ces souris ont une diminution de la mobilisation du cholestérol radiomarqué à partir des macrophages vers le plasma et les fèces, ce qui suggère que l'activité de PLTP altère le RCT [259]. Il a également été mis en évidence que la surexpression macrophagique de la PLTP n'affecte pas le RCT chez des souris sauvages [259]. In vitro, l'inhibition de l'activité de la PLTP sur des hépatocytes primaires réduit la sécrétion d'ApoB [260]. Les effets de la PLTP semblent donc dépendre de son site d'expression.

2.3.2.4.4 La CETP

Remodelage vasculaire de la distribution du cholestérol et RCT

La CETP est une enzyme de 74 kDa majoritairement sécrétée par le foie et le tissu adipeux et qui est transportée dans le plasma principalement liée aux HDL [255][261]. Dans le compartiment plasmatique, la CETP permet de catalyser l'échange du CE issu des αHDL contre des TG des lipoprotéines à ApoB. Cette action de la CETP permet de shunter le transport reverse du cholestérol puisque que le CE des HDL est alors remis en circulation dans les lipoprotéines de la voie endogène [211]. Les données disponibles sur l'action de la CETP dans le RCT sont contradictoires. En effet, aussi bien une élévation qu'une inhibition de l'activité de la CETP peut être favorable au RCT [262]. En facilitant le transfert du CE des HDL aux lipoprotéines à ApoB, la CETP favorise la captation hépatique du cholestérol via le récepteur aux LDL, ce qui pourrait alors représenter une voie alternative dans la voie RCT. L'expression de la CETP par un vecteur adénoviral chez la souris, espèce qui n'exprime pas la CETP de façon constitutive, conduit à un transfert plus important du cholestérol radiomarqué

issu de macrophages vers les fèces [259]. Cet effet favorable de la CETP sur le RCT nécessite la présence du récepteur aux LDL [263]. Dans le même temps, l'activité de la CETP induit une baisse de la quantité des HDL, antiathérogènes, concomitante à une augmentation de la quantité de particules proathérogènes. Chez le hamster, qui exprime la CETP de façon constitutive, un traitement avec le Torcetrapib ou le Dalcetrapib qui sont des inhibiteurs de la CETP, favorise le transfert du cholestérol issu des macrophages vers les fèces [264][265][266]. Avec l'Anacetrapib, un autre inhibiteur spécifique de la CETP, cet effet n'a été observé qu'en conditions dyslipidémiques [266][265]. Chez des souris transgéniques exprimant les formes humaines de la CETP et de l'ApoB100 sous régime gras, le traitement au Torcetrapib augmente le HDL cholestérol plasmatique et stimule le RCT [267]. Ainsi, l'inhibition de la CETP élève le niveau plasmatique de HDL, ce qui devrait théoriquement diminuer le risque de maladies cardiovasculaires, entre autre en stimulant RCT. Cependant, le rôle de la CETP dans RCT reste complexe, il est donc important d'éclaircir ses mécanismes d'action, en particulier au vu de l'intérêt croissant qui est porté à l'utilisation clinique des inhibiteurs de la CETP qui est présentée comme une nouvelle cible thérapeutique.

Point sur les inhibiteurs de la CETP

Différentes études, notamment la Framingham Heart Study, ont mis en évidence que la quantité plasmatique de HDL cholestérol est inversement corrélée aux risques CV [20][268]. De plus, chez l'homme une déficience en CETP induit une augmentation importante du niveau de HDL cholestérol ainsi qu'une augmentation modérée de la quantité plasmatique de l'ApoA1 [269]. Ainsi, à partir de ces données et des résultats précliniques obtenus sur les modèles animaux abordés ci-dessus, différentes équipes de recherche se sont focalisées sur le niveau circulant des HDL comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement des dyslipidémies et de l'athérosclérose. Avec pour objectif de réduire l'activité de la CETP, quatre molécules inhibitrices ont atteint le stade de développement clinique chez l'homme : le Torcetrapib, le Dalcetrapib et l'Anacetrapib et l'Evacetrapib.

Le Torcetrapib qui se fixe de façon non réversible à l'enzyme a montré son efficacité chez le lapin par inhibition du développement de l'athérosclérose [270]. Cependant chez l'homme, l'étude clinique de phase III ILLUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact IN ATtherosclerosis Events) à montré une augmentation de la mortalité toutes causes confondues dans le groupe traité par l'inhibiteur par rapport au groupe placebo, malgré une baisse du LDL-cholestérol de 25% et une augmentation de 72% de la quantité de HDL-cholestérol [271]. Cette augmentation de la mortalité est associée à des effets secondaires ayant un impact direct sur la survenue d'événements CV : le Torcetrapib induit une augmentation de l'aldostérone plasmatique conduisant à une élévation de la tension artérielle systolique. Des études complémentaires ont permis d'établir que le traitement au Torcetrapib induisait une augmentation de la synthèse d'aldostérone via une voie indépendante de l'inhibition de la CETP [272][273].

Le Dalcetrapib est une molécule qui a été développée suite à l'échec du Torcetrapib. Cet inhibiteur se lie à la CETP de façon irréversible néanmoins avec une liaison moins forte. Le Dalcetrapib a une activité spécifique ciblée et n'induit pas de problèmes de tension artérielle systolique ni d'augmentation de la synthèse d'aldostérone chez les patients [274]. Malgré une amélioration du profil lipidique chez l'homme en phase II via

une augmentation de 40% des HDL et une non modification du niveau de LDL [275], le développement du Dalcetrapib à été stoppé en phase III pour cause de futilité en terme de protection CV [276].

L'Anacetrapib, qui se lie de façon réversible à la CETP, est en cours de développement clinique. En 2007, une étude de phase I a mis en évidence chez des patients dyslipidémiques un effet marqué de l'Anacetrapib 300 mg après 10 jours de traitement [277]. Les HDL sont fortement augmentés (+129%) et les LDL diminués (-38%) sans modification de la pression artérielle. Des résultats similaires ont été obtenus pour des patients sous statines puis traités ou non avec l'Anacetrapib [278]. L'étude de phase II évaluant l'efficacité et la tolérance de l'administration d'Anacetrapib, avec pour critère principal le pourcentage de variation du LDL cholestérol confirme ces résultats encourageants sur le HDL et LDL cholestérol. Actuellement, une étude de phase III est en cours (REVEAL) sur 30 000 patients ayant un historique CV et avec pour critère principal d'évaluation la survenue d'événements coronaires majeurs (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01252953).

L'Evacetrapib est le quatrième inhibiteur de la CETP à être évalué en phase III de développement clinique. En phase II, l'Evacetrapib en monothérapie ou en association aux statines augmente drastiquement le HDL cholestérol (+80%) et diminue le LDL cholestérol de 10 à 15% [279]. Il est maintenant testé dans une étude de phase III, Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition With Evacetrapib in Patient at a High-Risk for Vascular Outcomes (ACCELERATE) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01687998). Le critère principal d'évaluation est un critère composite de morbi-mortalité CV.

2.3.2.5 Captage du cholestérol par le foie : importance dans le RCT

Suite à l'efflux du cholestérol des macrophages (Cf. § 2.3.2.2), le cholestérol des HDL est capté par le foie. Au niveau hépatique, les HDL peuvent se lier aux récepteurs SRB1 par l'intermédiaire d'interactions de type protéine-protéine. Ce récepteur clé, appelé CLA-1 chez l'homme, est exprimé de façon ubiquitaire, on le retrouve ainsi au niveau des hépatocytes, des entérocytes, des cellules endothéliales, des macrophages et des adipocytes [280][281]. SRB1, en plus de sa capacité de fixation des HDL, est capable de lier avec une moins forte affinité une large variété de substrats dont les LDL, les LDL oxydées et les VLDL [190]. Il permet aux hépatocytes de capter de manière sélective le CE des HDL, sans recourir à l'endocytose de la lipoprotéine [46], à la différence du LDLR. Les HDL s'appauvrissent en cholestérol, reformant ainsi des pré β HDL. Ce rôle majeur de SRB1 dans le captage sélectif du CE et dans le RCT a largement été étudié dans différents modèles, principalement murins. La surexpression hépatique de SRB1 entraîne une réduction drastique de la cholestérolémie et notamment une baisse de la concentration plasmatique du HDL-cholestérol, due à une augmentation du captage du CE au niveau du foie [282]. Chez ces souris, l'excrétion biliaire du cholestérol est augmentée [283]. On constate également chez ces animaux une baisse de la quantité de cholestérol associé au VLDL et LDL [282][284]. La surexpression hépatique de SRB1 facilite le transport du cholestérol dérivé des macrophages dans les fèces [285]. A l'inverse, un knock-down de SRB1 chez la souris conduit à une augmentation de la taille des HDL et de la concentration plasmatique en HDL cholestérol [286][287]. L'excrétion biliaire du cholestérol est alors diminuée. Le RCT macrophagique est réduit en l'absence de SRB1 [225][285]. La double invalidation de SRB1 et de l'ApoE chez la souris conduit au développement de

l'athérosclérose, à l'infarctus du myocarde et à une mort prématurée de l'animal [288]. SRB1 est donc un régulateur positif du RCT.

Récemment mis à jour, le complexe hépatique P2Y₁₃/ectoF1-ATP synthase facilite également le retour du cholestérol au foie en permettant la captation des HDL [289]. Ainsi, au niveau des hépatocytes, cette voie indépendante de SRB1 permet l'endocytose des HDL via deux sites de liaison aux HDL d'affinité différente. L'ApoA1 se lie au site de haute affinité de l'ATP synthase ectopique présente au sein de la membrane plasmique. La liaison de l'ApoA1 au complexe enzymatique permet l'activation de son activité hydrolase. L'ATP est alors convertie en ADP, ADP qui va activer le récepteur purinergique P2Y₁₃. L'activation de P2Y₁₃ entraîne une cascade de signalisation intracellulaire qui induit une réorganisation du cytosquelette conduisant à une endocytose des HDL dépendante de récepteurs de faible affinité [290]. L'invalidation du récepteur P2Y₁₃ induit une diminution du RCT à partir de macrophages chez la souris [289].

Comme c'est le cas pour SRB1 et P2Y₁₃, l'amélioration du captage hépatique du HDL cholestérol est associée à une augmentation de l'excrétion biliaire du cholestérol [289][291]. Ceci n'est cependant pas toujours vérifié. Par exemple, sans modification de l'expression de SRB1 et P2Y₁₃, les souris surexprimant la EL présentent un captage du CE provenant des HDL augmenté dans le foie. Malgré cela, ces animaux n'ont pas de modification de l'élimination du cholestérol via la voie biliaire [291].

2.3.3 Élimination biliaire du cholestérol

Le cholestérol hépatique en excès est éliminé dans la bile, soit directement sous forme de cholestérol, soit indirectement après sa conversion en acides biliaires. La formation de la bile a lieu essentiellement au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes. Le cholestérol des HDL entrant dans l'hépatocyte est métabolisé par une voie ne faisant pas intervenir de dégradation lysosomale. Le cholestérol est alors dirigé vers les canalicules biliaires et constitue ainsi la principale source de cholestérol biliaire. Le cholestérol utilisé pour la synthèse des sels biliaires proviendrait principalement de l'internalisation par les hépatocytes des particules VLDL et LDL [292][293]. Ces lipoprotéines sont dégradées par une voie dite intralysosomale. Le cholestérol est alors métabolisé en acide biliaire suite à l'action de différentes enzymes dont l'enzyme limitante CYP7A1. En outre, le cholestérol issu des VLDL et LDL peut être utilisé autrement, stocké ou remis en circulation par les hépatocytes. Chez l'homme, la bile est principalement constituée d'acides biliaires puis de phospholipides et en moindre mesure, de cholestérol [294]. Ce mélange est déversé au niveau de la partie proximale de l'intestin via le canal cholédoque.

2.3.3.1 Métabolisme des acides biliaires

Les acides biliaires sont des molécules amphiphiles synthétisées exclusivement au niveau du foie à partir du cholestérol. La synthèse des acides biliaires représente donc l'ultime étape du catabolisme du cholestérol. A partir de molécules hydrophobes de cholestérol, une chaîne de réactions enzymatiques va permettre d'aboutir à la synthèse de composés hydrosolubles en leur conférant des propriétés détergentes cruciales pour leur fonction physiologique : la formation de micelles facilitant l'absorption intestinale des lipides alimentaires ainsi que des vitamines liposolubles A, D, E et K [200].

Les produits formés à partir de la cascade de synthèse hépatique des acides biliaires sont les acides biliaires (AB) primaires. Chez l'homme, l'acide cholique (CA) et l'acide chénodéoxycholique (CDCA) sont les AB primaires. Ces AB peuvent être transformés respectivement par les bactéries intestinales en AB secondaires que sont l'acide déoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA).

Il existe 2 voies de formation des AB primaires par les hépatocytes. Elles se distinguent par l'ordre et le lieu des réactions qui permettent la transformation du cholestérol en AB primaire :

- la voie principale (ou neutre). Cette voie comporte 16 réactions enzymatiques, dont la première à lieu dans le RE. La première étape est limitante et est catalysée par le cytochrome P450 cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), localisée au sein du RE. Ishibashi *et al.* ont montré que des souris déficientes pour CYP7A1 présentent une absorption des graisses et des vitamines liposolubles fortement réduite, conduisant à une mort prématurée de l'animal lors des deux premières semaines de vie [295].
- la voie alternative (ou acide). Cette voie est initiée dans la mitochondrie par la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1). Il semble que l'étape limitante de la voie alternative soit le transport du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie. Cette voie représente 25% de la production d'AB chez la souris et 6% chez l'homme [296].

Avant leur sécrétion dans les canalicules biliaires, les AB primaires vont subir une étape de conjugaison avec la taurine ou la glycine. Cette réaction est catalysée par la Bile Acyl-CoA amino acid N-Acyltransferase (BAAT) au niveau du péroxysome. Le ratio entre AB glyco ou tauro-conjugés est déterminé par la biodisponibilité en taurine puisque la BAAT possède une meilleure affinité pour cet acide-aminé. Cette étape de conjugaison a pour but d'augmenter la solubilité, donc le caractère hydrophile des AB. Cette propriété physico-chimique acquise les empêchant de diffuser dans la membrane cellulaire, leur sécrétion implique donc l'intervention de transporteurs transmembranaires. Les AB conjugués sont activement sécrétés par les hépatocytes vers les canalicules biliaires via des transporteurs de la famille ABC.

2.3.3.2 Sécrétion des acides biliaires et du cholestérol dans la bile

Les AB sont exportés par différents transporteurs présents au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes. ABCB11 (Bile Salt Export Protein, BSEP) et ABCC2 (Multidrug Resistance associated Protein 2, MRP2) sont des protéines à ATP Binding Cassette qui permettent le transfert des acides biliaires respectivement monovalents et bivalents du compartiment cellulaire vers le canal biliaire [296][200].

L'hétérodimère ABCG5/ABCG8 qui est présent au sein de la membrane canaliculaire des hépatocytes, permet l'excrétion du cholestérol dans la bile [297]. Chez la souris, un knock-down d'ABCG5/G8 induit une baisse drastique de la quantité de cholestérol retrouvé dans la bile [298]. A l'inverse, une surexpression de l'hétérodimère conduit au phénotype inverse, soit une augmentation de l'efflux du cholestérol dans la bile [70]. Chez l'homme, ABCG5/G8 est principalement exprimé dans le foie tandis que ce gène est principalement exprimé dans l'intestin chez la souris [299]. Des mutations sur les gènes codant les protéines ABCG5/G8 peuvent induire une sitostérolémie. Cette maladie se caractérise par une concentration élevée de cholestérol et de phytostérols dans le sang due à une augmentation de l'absorption et à une forte réduction de la sécrétion biliaire de ces molécules [72].

Ainsi, dans un modèle de souris déficient pour l'hétérodimère ABCG5/G8, on observe une faible excrétion biliaire du cholestérol par les hépatocytes [298]. Par ailleurs, il a été montré que SRB1 est exprimé au niveau de la membrane basolatérale mais aussi au sein de la membrane canaliculaire des hépatocytes chez la souris [300]. Wiersma *et al.* proposent que l'excrétion du cholestérol observée suite à un knock-down d'ABCG5/G8 soit liée au niveau d'expression hépatique de SRB1. De plus, les auteurs ont mis en avant que la surexpression adénovirale de SRB1 au niveau du foie chez des souris sauvages C57Bl/6 induit une augmentation de la sécrétion du cholestérol dans la bile et que cette élévation est maintenue chez des souris déficientes en ABCG5 [300]. SRB1 semblerait donc jouer un rôle dans l'efflux biliaire du cholestérol, indépendamment des transporteurs ABCG5/G8, bien que son rôle paraisse mineur comparé à celui de l'hétérodimère [300].

L'efflux du cholestérol dans la bile par ABCG5/G8 et SRB1 dépend de la présence de ses accepteurs : les PL et les AB [301]. Il a été montré par Vrins *et al.* sur un modèle de cellules épithéliales de vésicule biliaire canine en culture que les AB les plus hydrophobes tels que le taurocholate et le taurodésoxycholate induisent un efflux plus important du cholestérol que les AB plus hydrophiles tels que le tauroursodeoxycholate. L'étude ne permet cependant pas d'établir une relation directe entre le degré d'hydrophobicité des AB et le transporteur ABCG5/G8. Par ailleurs, l'ajout de phosphatidylcholine aux AB permet de potentialiser leur effet. De façon intéressante, des liposomes de phosphatidylcholine sans AB ne sont pas capables d'induire l'efflux du cholestérol par ABCG5/G8 [301]. Les PL, dont la phosphatidylcholine, sont les accepteurs indispensables du cholestérol dans la bile. Ils sont excrétés par l'intermédiaire d'ABCB4. Ainsi, une inactivation d'ABCB4 chez la souris conduit à une absence quasi-totale de cholestérol sécrété dans la bile [302].

2.3.3.3 Elimination et réabsorption des acides biliaires

Chez l'homme, durant le jeun, la bile s'écoule dans la vésicule biliaire. Lors de la prise alimentaire, la vésicule biliaire se contracte en réponse à la cholécystokinine, la bile est alors déversée dans le duodénum via le canal cholédoque. Les AB peuvent ainsi jouer leur rôle de détergents, facilitant l'absorption entérocytaires des différents lipides et vitamines liposolubles. Les AB sont ensuite majoritairement réabsorbés au niveau de l'iléon et retournent au foie par la veine porte. On considère que 95% des AB sont réabsorbés par l'intestin et retournent au foie [296]. De fait, seulement 5% des AB sont définitivement éliminés de l'organisme dans les fèces.

En plus de leur implication directe dans l'absorption des lipides, les AB ont un rôle de molécules de signalisation : via FXR hépatique pour le rétrocontrôle de la synthèse des AB dans le foie (Cf. § 2.3.4.2) et via FXR intestinal pour le contrôle de l'expression et de la sécrétion de FGF15/19 (Fibroblast Growth Factor 15, chez la souris et FGF19, chez l'homme) qui inhibe également la synthèse des acides biliaires. Au niveau intestinal, les AB via FXR stimulent l'expression et la sécrétion de FGF15/19 dans la circulation sanguine. Au niveau du foie, FGF15/19 se lie à son récepteur membranaire FGFR4 et inhibe l'expression de la CYP7A1 [303][200].

2.3.4 Régulation du RCT

Plusieurs ligands naturels et agents pharmacologiques sont capables de moduler le RCT. Ainsi chez la souris, l'inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol par l'ézétimibe induit une augmentation du RCT [304][305]. Par ailleurs, trois facteurs de transcription principaux régulent le RCT : LXR, PPAR et FXR.

2.3.4.1 LXR

Un des effets le mieux caractérisé de LXR est de stimuler le RCT. ABCA1 est l'un des gènes cibles de LXR parmi les premiers identifiés et est l'un des gènes les plus fortement régulés par LXR [306]. Les agonistes de LXR induisent fortement l'expression d'ABCA1 dans les macrophages, mais aussi dans de nombreux tissus périphériques tels que l'intestin [307]. L'activation de LXR par un agoniste permet de stimuler l'efflux du cholestérol à partir d'ABCA1 vers l'ApoA1 [306]. ABCG1 agit de concert avec ABCA1 pour permettre l'efflux du cholestérol de la cellule vers les HDL. Des études récentes semblent indiquer qu'ABCG1 fonctionnerait essentiellement comme un transporteur intracellulaire [308]. ABCG1 est une cible de LXR qui stimule alors le transport et l'efflux cellulaire du cholestérol. LXR stimule également l'excrétion et la conversion du cholestérol en acide biliaire via une régulation positive de l'hétérodimère ABCG5/G8 [309] et de l'enzyme CYP7A1 [310]. Un certain nombre d'études ont évalué le rôle de LXR dans le RCT des macrophages. Chez la souris, suite à l'activation pharmacologique de LXR, le RCT des macrophages vers les fèces est augmenté [311][312]. De façon intéressante, l'activation spécifique de LXR dans l'intestin inhibe l'absorption du cholestérol via l'induction d'ABCG5/G8 ainsi que la régulation négative de l'expression de NPC1L1 [313][312]. Conformément à ces données, le RCT est augmenté chez les souris transgéniques surexprimant spécifiquement LXR dans l'intestin [313] et chez des souris traitées avec un agoniste de LXR spécifique de l'intestin [309]. Au niveau hépatique, l'activation de LXR par un traitement avec un agoniste induit une augmentation de l'excrétion biliaire de cholestérol mais stimule aussi la lipogenèse [309]. Par ailleurs, les agonistes systémiques de LXR augmentent le risque de lithiases biliaires [314] et favorise le développement de la stéatose hépatique [315], deux freins à leur développement clinique. Enfin, l'activation spécifique de LXR au niveau hépatique stimule l'expression des gènes de la lipogenèse et de l'efflux du cholestérol mais de façon surprenante, ne modifie pas le RCT [313].

2.3.4.2 FXR

FXR est un récepteur nucléaire aux acides biliaires [316]. Chez l'homme, le gène codant FXR (NR1H4) est principalement exprimé dans le foie, l'intestin, les reins et les surrénales [317]. Le CDCA principalement et, dans une moindre mesure, le CA sont les agonistes naturels de FXR. L'activation de FXR par ses ligands entraîne sa fixation au niveau d'éléments de réponse appelés FXRE (FXR response Element). Comme LXR, FXR peut former un hétérodimère avec RXR et ainsi moduler l'expression de ses gènes cibles au niveau d'éléments de réponse FXRE (FXR Response Element) sur l'ADN. FXR peut aussi réprimer l'expression de gènes de façon indirecte via l'induction de l'expression du récepteur nucléaire SHP (Small Heterodimer Partner).

FXR protège les hépatocytes d'une surcharge toxique en AB en supprimant leur synthèse *de novo*, en accélérant leur détoxification par excrétion hépatique et en inhibant leur réabsorption intestinale. La modulation de FXR a une conséquence directe sur le métabolisme du cholestérol. En effet, FXR est impliqué

dans le contrôle du métabolisme du cholestérol à travers la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes, dont l'ApoA1, la CYP7A1, la PLTP, les ApoCII et ApoCIII [143]. Ainsi, les AB répriment leur propre synthèse à partir du cholestérol via FXR en inhibant indirectement l'expression de l'enzyme limitante de cette étape : la CYP7A1. Globalement, FXR inhibe la production des AB tandis que LXR la stimule. Chez la souris, l'activation de FXR soit par un traitement au GW4064 qui est un agoniste spécifique de FXR, soit par un traitement adénoviral de la forme constitutivement active de FXR, induit une augmentation du transport du cholestérol des macrophages vers les fèces et une baisse du niveau circulant des HDL [318]. Ce résultat s'explique en partie par l'implication de SRB1 puisque les effets de l'agoniste de FXR sur le RCT sont réduits chez des souris déficientes en SRB1 [318]. FXR module également le métabolisme des HDL. Les souris déficientes pour FXR présentent une augmentation du HDL cholestérol, en partie due à une altération du RCT. En effet, ces souris ont une diminution du captage par le foie du HDL cholestérol, concomitante à une baisse de l'expression de SRB1 au niveau hépatique [319]. SRB1 est stimulé par les AB via FXR [320][319]. De plus, chez la souris FXR régule positivement l'expression hépatique de la PLTP [321] et négativement l'expression de la HL et de la CETP qui contribue au remodelage des HDL [322].

Les données sur l'effet de FXR sur l'athérosclérose sont controversées. Malgré un profil lipoprotéique proathérogène, les souris invalidées pour FXR ne développent pas d'athérosclérose sous régime standard, gras ou riche en cholestérol [323][324]. Les souris déficientes pour FXR ont donc été croisées avec des souris susceptibles pour l'athérosclérose *ie.* knock-out pour le LDLR et l'ApoE. Les souris mâles doublement invalidées pour FXR et l'ApoE sous régime riche en cholestérol développent des lésions athéromateuses [323]. A contrario, dans une autre étude il a été montré sous un même régime que les lésions chez des souris femelles double déficientes en FXR et ApoE étaient moins marquées que pour des souris ApoE contrôles [325] et des souris mâles doublement invalidées pour FXR et le LDLR présentaient également des lésions athéromateuses moins prononcées que pour des souris LDLR knock-out [324]. Les raisons de ces différences restent inexplicables cependant, deux études rapportent l'effet d'agonistes de FXR chez des souris déficientes en LDLR ou ApoE sous régime de type Western et montrent que l'activation de FXR réduit les lésions athéromateuses au niveau aortique [326][327].

2.3.4.3 PPAR

Les PPAR sont des facteurs de transcription qui modulent l'expression de gènes impliqués dans plusieurs processus biologiques dont le métabolisme des lipides [328]. Une fois activés par ces ligands naturels ou par des agonistes synthétiques, les PPAR forment un hétérodimère avec le RXR [329]. Le complexe PPAR / RXR se lie à l'ADN sur les PPRE (PPAR Response Element) au niveau de ses gènes cibles et induit leur expression. PPAR α & PPAR δ sont les deux PPAR majoritairement impliqués dans la régulation du RCT.

Chez les souris, la cholestérolémie est diminuée suite à un traitement par des agonistes de PPAR α , principalement due à une baisse du HDL cholestérol [330]. A contrario, les souris déficientes pour PPAR α présentent le phénotype inverse. Chez l'homme, l'activation de PPAR α induit l'expression de l'ApoA1 conduisant à une augmentation de sa concentration plasmatique, l'effet opposé est observé chez la souris [331]. L'expression de ABCA1 est augmentée par PPAR α dans l'intestin et dans les macrophages [332][333].

Comme vu précédemment, l'intestin produit les chylomicrons et des HDL (Cf. § 2.1.2.4) et exprime PPAR α . Colin *et al.* ont montré que l'activation de PPAR α par un agoniste (GW7647) chez la souris ou sur des biopsies jéjunales humaines augmente l'expression des gènes impliqués dans la production des HDL. Les auteurs montrent *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur des cellules Caco-2 et humaines issues de biopsies jéjunales que le GFT505 (agoniste synthétique de PPAR α) mais pas le fénofibrate induit l'expression génique de l'ApoAI et du transporteur ABCA1 au niveau intestinal. Sur des cellules Caco-2, l'activation de PPAR α induit la production des HDL mais diminue la sécrétion de l'ApoB [334].

PPAR α permet également de stimuler le RCT en augmentant l'expression protéique de SRB1 au niveau des macrophages après un traitement avec des agonistes de PPAR α ou γ . Chez les souris, les fibrates, qui sont des agonistes synthétiques de PPAR α , diminuent l'activité plasmatique de la LCAT [335]. Pour ce qui concerne les enzymes plasmatiques, l'expression hépatique et l'activité plasmatique de la PLTP sont augmentées suite à un traitement aux fibrates chez des souris sauvages mais pas chez des souris déficientes en PPAR α [336]. Enfin, une étude monte sur des souris transgéniques exprimant la CETP traitées avec du fénofibrate, que l'expression hépatique et l'activité de cette enzyme de transfert sont réduites en parallèle d'une augmentation plasmatique du HDL cholestérol [337]. Chez la souris, différentes études ont montré l'effet bénéfique de la supplémentation du régime alimentaire avec des agonistes de PPAR δ ou α sur le RCT des macrophages vers les fèces [305][338].

2.3.5 RCT et intestin

Par l'importance qu'a NPC1L1 dans l'absorption intestinale du cholestérol, la modulation de son activité affecte l'excrétion fécale du cholestérol d'origine macrophagique. En effet, un traitement à l'ézétimibe [304][305] ou par des agonistes de PPAR α [339] et δ [305] augmente l'excrétion fécale du cholestérol macrophagique via une réduction de l'activité et de l'expression de NPC1L1. Autrement dit, l'ézétimibe limite la réabsorption du cholestérol excrété par la voie du RCT. Par ailleurs, l'activation spécifique de LXR dans l'intestin par un agoniste ou via l'utilisation de transgène augmente le RCT macrophagique [313]. Cet effet est principalement associé à une augmentation de l'expression d'ABCA1 et d'ABCG5/G8 et à une réduction de l'expression de NPC1L1 au niveau intestinal [313].

2.4 L'excrétion transintestinale du cholestérol ou TICE

C'est en 1968 que Glomset *et al.* introduisent pour la première fois le concept de transport inverse du cholestérol [340] (Cf. § 2.3). Jusqu'à très récemment, la voie du RCT conduisant à l'excrétion biliaire était considérée comme étant la seule voie d'épuration et d'élimination du cholestérol plasmatique. Depuis quelques années, plusieurs études remettent en question le modèle initialement proposé.

2.4.1 Observations initiales

2.4.1.1 Preuves indirectes de l'existence du TICE chez les rongeurs

Classiquement, l'excrétion fécale de cholestérol est décrite comme étant la résultante de la somme de l'excrétion biliaire de cholestérol, du cholestérol alimentaire et/ou biliaire non absorbé, de la synthèse endogène et de la desquamation des cellules intestinales. Toutefois, dans de nombreux cas, cette règle n'est pas vérifiée suggérant qu'une composante est manquante. Dès 1927, Sperry *et al.* ont montré que des chiens présentant une dérivation du canal biliaire avaient une quantité anormalement élevée de cholestérol dans leurs fèces par rapport aux résultats obtenus chez des chiens contrôles [341]. Cela a été confirmé plus tard par Pertsemliadis *et al.* [342]. Le développement de modèles de souris génétiquement modifiées a permis de renforcer cette notion d'un découplage entre l'excrétion biliaire et l'excrétion fécale du cholestérol [343]. Ainsi, 80 ans après les observations de Sperry, Kruit *et al.* montrent que les souris déficientes pour le transporteur ABCB4, une flippase à phospholipides située au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes, présentent une absence de sécrétion biliaire en phospholipides et par conséquent, en cholestérol. Paradoxalement, on retrouve les mêmes niveaux de stérols neutres dans les fèces de ces souris déficientes en ABCB4 par rapport à des souris contrôles [52].

Les souris invalidées pour les transporteurs ABCG5/G8 ont une excrétion biliaire du cholestérol réduite de 90 %. De manière surprenante, ces souris en dépit d'une absence de défaut d'absorption intestinale, ne montrent pas le faible niveau attendu de stérols neutres dans leurs fèces [298]. L'excrétion fécale de cholestérol est seulement diminuée de 36% par comparaison aux souris sauvages. La surexpression hépatique de NPC1L1 chez la souris permet de réabsorber le cholestérol initialement excrété dans la bile par les transporteurs ABCG5/G8. La conséquence de cette surexpression hépatique est donc une absence quasi totale de cholestérol dans la bile. De façon intéressante, ces souris, qui ne présentent pas d'altération de l'absorption intestinale de cholestérol, ne montrent pas non plus de différences d'excrétion fécale de cholestérol [344].

La même équipe de recherche a montré que les souris déficientes en ACAT2 ou les souris sauvages chez lesquelles ACAT2 est inhibée présentent une excrétion biliaire de cholestérol normale mais une excrétion fécale de cholestérol fortement stimulée [345]. En 2011, une étude menée par Castro-Perez *et al.* laisse supposer l'existence d'une voie complémentaire à la voie biliaire. Cette équipe s'est intéressée à l'action de l'Anacetrapib, qui est un inhibiteur réversible de la CETP, chez le hamster [265]. Leurs résultats montrent une forte augmentation de l'excrétion fécale du cholestérol sans modification de l'absorption entérocytaire ni de l'excrétion biliaire du cholestérol par le foie.

2.4.1.2 Preuves indirectes de l'existence du TICE chez l'homme

En 1959, Cheng *et al.* ont déterminé l'origine du cholestérol chez des patients ayant une obstruction complète du canal biliaire en raison d'un carcinome de la tête du pancréas. Ces patients se caractérisent par une absence d'excrétion biliaire du cholestérol. Suite à la mesure de l'apport en cholestérol alimentaire, de l'absorption intestinale du cholestérol et l'excrétion fécale du cholestérol chez ces patients Cheng a clairement établi l'existence d'une sécrétion de cholestérol par la muqueuse intestinale [346]. De même, Simmons *et al.* ont confirmé l'existence d'une telle voie en utilisant un système de tube à triple lumière. Le pourcentage de cholestérol excrété par l'intestin a été estimé à environ 44% de la production fécale totale [347]. Cependant, ces deux études chez l'homme ne prouvent pas que le cholestérol excrété par l'intestin est d'origine plasmatique. Une des limites majeure de ces études est l'absence d'excrétion biliaire dans la lumière intestinale. En effet, l'absence d'acides biliaires peut affecter l'absorption du cholestérol. En 2012, l'équipe de Groen a estimé, via une méthode de combinaison de radio-isotopes stables chez des hommes modérément hypercholestérolémiques que le TICE représentait plus de 30% des pertes fécales totales des stérols neutres (ISA Mars 2012, Sydney, Abstract n ° 274, Jakulj *et al.* 2012). Sur la base d'une méthodologie précédemment décrite [348], ils montrent ainsi que comme chez la souris, le TICE est chez l'homme une voie majeure pour l'excrétion fécale du cholestérol plasmatique. Le cholestérol biliaire, le cholestérol alimentaire non absorbé et la desquamation cellulaire comptent chacun pour environ 20% de l'excrétion fécale des stérols neutres.

2.4.2 Preuve de l'existence du TICE chez la souris

La preuve expérimentale directe de l'existence du TICE chez la souris a été obtenue en 2007 par Van der Velde *et al.* [14]. Cette preuve a été obtenue suite à l'utilisation d'une technique de dérivation biliaire puis de perfusion intestinale. Brièvement, après anesthésie de la souris, la bile est dérivée et collectée par gravimétrie. L'intestin proximal, médian, distal (environ les 10 premiers centimètres pour chaque) ou le colon est perfusé à un flux stable de 3 ml/heure. La solution de perfusion est composée d'une solution de Krebs supplémentée ou non avec un mélange de plus ou moins taurocholate et / ou phosphatidylcholine comme accepteur de cholestérol. Du ³H-cholestérol dilué dans de l'intralipide est ensuite injecté via la veine pénienne. Les perfusats intestinaux sont collectés toutes les 15 minutes sur 120 minutes et enfin la radioactivité associée aux fractions biliaires et intestinales récupérées est dosée.

Il a été montré à l'aide d'une approche isotopique que le TICE contribue pour 33% à l'excrétion fécale de cholestérol chez des souris C57Bl/6J. La desquamation des cellules intestinales et la non absorption entérocytaire représentent respectivement 33% et 16% tandis que la voie biliaire ne représente que 17% de l'excrétion fécale de cholestérol [348]. La contribution de la synthèse endogène hépatique et intestinale à l'enrichissement des fèces en cholestérol est mineure. La voie du TICE est donc majoritaire chez la souris dans des conditions standards, elle permet l'excrétion de deux fois plus de cholestérol dans les fèces que la voie biliaire. La même équipe a établi que le TICE suivait un gradient le long de l'intestin. Il est maximal au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle puis décroît de moitié à chaque région anatomique, médiale puis distale, pour être minimale au niveau du colon [14].

2.4.3 Acteurs moléculaires impliqués

2.4.3.1 Origine du cholestérol pour le TICE

A l'initiation de ma thèse, peu de données étaient disponibles concernant l'origine du cholestérol excrété par l'intestin. Van der Veen *et al.* avaient montré que le cholestérol excrété par l'intestin provenait majoritairement du compartiment sanguin plutôt que de l'intestin lui-même [348]. Ceci a été confirmé par de nombreuses études où le cholestérol injecté par voie intraveineuse a été retrouvé dans les fèces des souris présentant une dérivation biliaire [14] ou ayant une excrétion biliaire du cholestérol fortement altérée [52]. Les études disponibles montraient que l'intralipide 20%, une émulsion de lipides principalement composée d'acides gras ainsi que des micelles riches en TG pouvaient fournir du cholestérol pour la voie du TICE [348][14][52].

L'identification de l'origine du cholestérol pour la voie du TICE a fait l'objet de recherches dont les résultats sont publiés dans mon premier travail de thèse (article 1).

2.4.3.2 Au niveau de la membrane basolatérale de l'entérocyte

2.4.3.2.1 Le récepteur scavenger de classe B, type 1 (SRB1)

Le récepteur scavenger de classe B type 1 est un transporteur membranaire de 82 kDa qui joue un rôle crucial dans le RCT au niveau du foie en facilitant la captation des HDL par reconnaissance de l'ApoAI (Cf. § 2.1.2.2.3 et § 2.3.2.2). SRB1 est exprimé dans l'intestin grêle au niveau de la membrane apicale mais aussi au pôle basolatéral des entérocytes [58]. Cette localisation interroge sur son implication possible dans le captage intestinal des lipoprotéines [58] et donc potentiellement sur son rôle dans le TICE.

Van der Velde *et al.* ont montré par une analyse d'expression de gènes dans l'intestin que l'expression de SRB1 est augmentée chez des souris soumises à un régime de type Western par rapport à des souris sous régime contrôle et que cette augmentation est encore plus marquée chez des souris soumises à un régime riche en lipides (High-fat). Sur l'ensemble des gènes présentés dans l'étude, seule l'expression de SRB1 était corrélée au TICE. Cependant, la mesure du TICE via la technique de perfusion intestinale *in vivo* chez des souris déficientes en SRB1 montre une augmentation du TICE (+100%) par rapport à des souris sauvages [349]. Les auteurs commentent ce résultat en rappelant que SRB1 est également potentiellement impliqué dans l'absorption intestinale du cholestérol. La même équipe de recherche rapporte quatre ans plus tard qu'en utilisant la même technique de mesure sur des animaux de même fond génétique [286] que le TICE n'est pas significativement affecté chez des souris déficientes en SRB1 par rapport à des souris contrôles [350]. Des travaux récemment publiés par Bura *et al.* montrent que l'absorption intestinale du cholestérol et l'excrétion fécale des stérols neutres ne sont pas altérés chez des souris qui surexpriment SRB1 au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle. Bura *et al.* ont ensuite croisé des souris sauvages ou surexprimant SRB1 au niveau de l'intestin avec les souris surexprimant NPC1L1 dans le foie (Cf. § 2.4.1.1) qui se caractérisent par un défaut d'excrétion biliaire de cholestérol. Ils montrent ainsi que la surexpression de SRB1 n'altère pas l'excrétion fécale des stérols neutres chez des souris sauvages ou présentant une absence d'excrétion biliaire de cholestérol [351]. Les auteurs concluent leur étude en indiquant que si SRB1 est impliqué, son rôle n'est pas limitant. Il aurait été intéressant

de mesurer spécifiquement chez ces souris l'excrétion fécale de ^3H -cholestérol après injection intraveineuse de HDL marquées au ^3H cholestérol oléate.

Le rôle de SRB1 dans l'intestin fait encore l'objet d'un débat, notamment par rapport à son importance dans le TICE; ce qui nécessite de poursuivre les recherches. Il est en effet possible que d'autres transporteurs du cholestérol soient impliqués au niveau basolatéral dans le captage du cholestérol plasmatique pour la voie du TICE.

2.4.3.2.2 LDLR

Le récepteur aux LDL (Cf. § 2.2.2) est exprimé au sein de l'intestin grêle chez l'homme et chez les rongeurs [99][98] au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes [98]. Il est capable de fixer et d'internaliser les particules de LDL [352]. De plus, après le foie, l'intestin grêle est le second organe le plus important dans le captage des lipoprotéines via le LDLR [353]. La question de l'implication et du rôle du LDLR dans le TICE a fait l'objet de recherches dont les résultats sont publiés dans mon premier travail de thèse (article 1).

2.4.3.3 Au niveau intracellulaire

Le TICE implique le transport intracellulaire du cholestérol via différents acteurs moléculaires. Vrins *et al.* ont mis en évidence que les niveaux d'expression de gènes liés au transport vésiculaire intracellulaire du cholestérol tels que Rab9 et Limp2 sont accrus suite à un traitement avec un agoniste de PPAR δ , le GW610742 [354]. Rab8 est impliqué dans la régulation des mécanismes qui mènent à l'élimination du cholestérol endocyté, dépendants d'ABCA1 [355]. Rab9 joue un rôle dans le trafic du cholestérol à partir des endosomes tardifs vers le réseau trans-golgien [356][357]. La protéine Limp2 a des fonctions spécifiques dans le trafic vésiculaire intracellulaire [358]. Sur la base que dans ces mêmes conditions, le TICE est significativement induit, ces données suggèrent que ces transporteurs pourraient jouer un rôle dans cette voie. Des travaux complémentaires seraient nécessaires pour valider ou réfuter cette hypothèse.

L'implication d'ACAT2 dans la voie moléculaire du TICE a été étudiée par Brown *et al.* en 2008 [345]. Cette enzyme, qui est exprimée dans les hépatocytes ou les entérocytes [359], a un rôle clé dans la production des lipoprotéines à ApoB [360][361]. Ainsi, l'utilisation d'oligonucléotides antisens ACAT2 chez des souris déficientes en LDLR induit une diminution de la concentration plasmatique en cholestérol, principalement à cause d'une baisse de la concentration plasmatique des VLDL et LDL. Ces animaux présentent une excrétion fécale des stérols neutres deux fois plus importante que pour des souris contrôles sans changement de l'excrétion hépatobiliaire du cholestérol. De plus, l'injection de cholestérol radiomarqué d'origine hépatique chez ces souris montre une accumulation plus importante du cholestérol dans la lumière de la partie proximale de l'intestin par rapport à des souris contrôles. Ces résultats suggèrent fortement que l'estérification intracellulaire du cholestérol régule négativement le TICE et que le cholestérol libre est préférentiellement utilisé pour l'efflux de la cellule par rapport au cholestérol estérifié. Ces travaux mettent également en avant l'hypothèse développée par Temel *et al.* sur l'importance du métabolisme hépatique dans le TICE [362].

2.4.3.4 Au niveau de la membrane apicale de l'entérocyte

Au niveau apical, NPC1L1 et ABCG5/G8 semblent être les protéines les plus susceptibles de participer au TICE.

2.4.3.4.1 NPC1L1

NPC1L1 (Cf. § 2.1.2.2.3) est la protéine limitante de l'absorption intestinale du cholestérol [54] et est inhibée par l'ézétimibe [54]. Il semble donc logique de penser qu'une inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol pourrait stimuler le TICE en empêchant la réabsorption du cholestérol excrété. Toutefois, l'implication de NPC1L1 dans le TICE reste à ce jour controversée. Deux études du même laboratoire montrent des résultats contradictoires. Vrins *et al.* montrent avec une technique de perfusion intestinale qu'un traitement à l'ézétimibe ne modifie pas l'excrétion transintestinale du cholestérol [354]. A l'inverse, la seconde étude montre en utilisant la technique des traceurs stables que le TICE est fortement induit suite à un traitement avec la même dose d'ézétimibe [363].

Le niveau intestinal d'expression du gène codant NPC1L1 a été évalué suite à l'induction du TICE. Deux études montrent que l'expression de NPC1L1 est négativement corrélée au TICE [349][354] alors qu'une troisième étude ne trouve pas de changement de son niveau d'expression [348]. Plus d'études seront donc nécessaires pour pouvoir conclure quand à l'effet de l'ézétimibe et donc du transporteur NPC1L1 sur le TICE.

2.4.3.4.2 ABCG5/G8

La question de l'implication des transporteurs ABCG5 et ABCG8 dans le TICE est cohérente puisqu'au niveau intestinal, ils régulent négativement l'absorption en facilitant la sécrétion du cholestérol de l'entérocyte vers la lumière (Cf. § 2.1.2.3). Cet hétérodimère qui est exprimé au niveau de la membrane apicale des entérocytes [364] a fait l'objet de plusieurs publications afin de déterminer son importance fonctionnelle dans le TICE.

En 2007 Van der Velde *et al.* montrent via l'utilisation d'une méthode directe de perfusion intestinale, que les souris déficientes en ABCG8 ont un TICE inchangé par rapport aux souris sauvages [14]. En 2009, Van der Veen *et al.*, en utilisant une méthode de traceurs stables, ont montré que le TICE est réduit de 40% chez des souris déficientes en ABCG5 [348]. La mesure du TICE chez des souris double knock-down n'a pas été réalisée. Néanmoins, ces études justifient cette conclusion : dans le foie, l'absence d'ABCG5 ou d'ABCG8 n'a que peu d'effet sur le TICE suggérant que d'autres transporteurs sont impliqués au niveau apical dans l'efflux du cholestérol. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au rôle du transporteur multi-drogues ABCB1.

La contribution de l'hétérodimère ABCG5/G8 dans la voie du TICE nécessite encore d'être éclaircie. Néanmoins, les travaux de Van der Veen *et al.* apportent une preuve robuste quant à l'implication d'ABCG5 dans l'excrétion transintestinale du cholestérol.

2.4.3.4.3 ApoAI

L'ApoAI est produite au niveau du foie mais aussi au niveau de l'intestin où elle entre dans la composition des chylomicrons et des HDL intestinales. Danielsen *et al.* [365] ont montré sur de l'intestin grêle de porc qu'à jeun, l'ApoAI peut être sécrétée au niveau du pôle apical des entérocytes et rester bloquée au sein de la bordure en brosse. Suite à l'exposition à des détergents comme les acides biliaires, qui sont naturellement présents dans la

lumière intestinale et qui sont des modulateurs positifs du TICE, l'ApoAI peut être décrochée de la bordure en brosse. Les auteurs suggèrent que l'ApoAI jouerait un rôle dans l'étape finale du TICE via sa fonction d'accepteur du cholestérol. L'ApoAI aurait donc un rôle dans l'efflux du cholestérol dans la lumière intestinale, en période de jeûne. Ces travaux posent la question du transporteur qui permettrait la lipidation de l'ApoAI au sein des microvillosités entérocytaires. De plus, la contribution de l'ApoAI pour faciliter l'efflux du cholestérol de la membrane apicale des entérocytes vers la lumière intestinale n'a pas été quantifiée dans la voie du TICE. L'hypothèse faite par Danielsen d'une contribution de l'ApoAI extra-intestinale dans le TICE nécessite d'être testée.

2.4.4 Le TICE est modulable

Différentes études chez la souris ont fait la démonstration que le TICE est une voie inductible.

2.4.4.1 Facteurs présents dans la lumière intestinale

Van der Velde *et al.* ont mis en évidence que la présence d'accepteurs du cholestérol dans la lumière intestinale stimule fortement le TICE [14]. En effet, *in vivo* le TICE est mesurable mais faible en absence d'accepteurs du cholestérol et plus de 80% du cholestérol présent dans les perfusats intestinaux ont alors pour origine la desquamation entérocytaire. Le taurocholate (TC) 10 mmol/l, un acide biliaire ou la phosphatidylcholine (PC) 2 mmol/l seuls sont moins efficaces que le mélange TC/PC (10 : 2 mmol/l). Ces molécules permettent la formation de micelles qui vont pouvoir solubiliser le cholestérol efflué par les cellules intestinales. Aussi, afin d'évaluer si le degré d'hydrophobicité des AB présents dans la lumière intestinale influence l'efflux du cholestérol, Van der Velde *et al.* ont mesuré le TICE avec la méthode de cannulation en présence d'AB plus hydrophiles (Tauroursodeoxycholate, TUDC) ou plus hydrophobes (taurodeoxycholate, TDC) que le TC. Les auteurs montrent chez des souris sauvages qu'à différentes concentrations, le TUDC combiné avec de la PC ou que le TDC combiné avec de la PC permettent un niveau de TICE comparable à celui observé pour le mélange TC/PC [349]. Il semble donc que le TICE chez la souris soit insensible à la concentration et aux types d'AB présents dans la lumière intestinale.

En présence du mélange TC/PC, seulement 30% du cholestérol provenant de l'intestin peut être issu de la desquamation. Bien que le mélange TC/PC soit le plus efficace que le TC ou la PC seuls, le niveau de cholestérol excrété par l'intestin semble principalement lié à la quantité de PL présents dans les perfusats intestinaux [14]. De façon intéressante, la nécessité de la présence de PL pour le TICE est équivalente à la nécessité de la présence des PL dans la bile pour l'efflux du cholestérol [52]. De plus, le TICE est le plus élevé au niveau de la partie proximale de l'intestin, région dans laquelle les acides biliaires et les phospholipides de la bile sont déversés.

2.4.4.2 Modulation nutritionnelle

Le TICE est affecté par le statut nutritionnel et par des manipulations du régime alimentaire fourni aux souris. Van der Velde *et al.* ont montré qu'un régime gras ou un régime de type Western stimulent le TICE [14]. Un régime de type Western augmente le TICE de plus de 50% par rapport à un régime standard. Le TICE est encore

plus augmenté chez des souris soumises à un régime gras (+100%). De façon intéressante, un régime seulement riche en cholestérol (2% de cholestérol, sans autres lipides) est sans effet sur le TICE suggérant que cette voie d'excrétion est sensible à la teneur et à la composition en lipides de l'alimentation.

Sokolovic *et al.* ont montré qu'une période de jeûne de 12H00 réduit le TICE de 28%. A l'inverse, une période de jeûne de 48H00 entraîne une augmentation du TICE de 50% [366]. Aucune explication n'est apportée par les auteurs pour expliquer la variation du TICE au cours du jeûne.

En 2011, Brufau *et al.* se sont intéressés à l'effet des phytostérols sur le TICE [367]. Ils ont montré qu'en plus de réduire l'absorption intestinale du cholestérol [71], les phytostérols stimulent le TICE [367]. En effet, les phytostérols entraînent une diminution de la concentration plasmatique de LDL cholestérol. Ainsi, des souris sauvages ou déficientes pour le transporteur ABCG5 nourries avec un régime supplémenté en phytostérols présentent une diminution de l'absorption du cholestérol concomitante à une importante augmentation de l'excrétion fécale des stérols neutres. Dans ces conditions, le TICE est fortement augmenté chez les souris sauvages, moitié moins chez les souris déficientes en ABCG5. Ces résultats suggèrent donc qu'une grande partie de l'effet hypocholestérolémiant des phytostérols serait lié à une augmentation du TICE, en partie dépendante de la fonction d'ABCG5.

2.4.4.3 Modulation pharmacologique

2.4.4.3.1 Les agonistes de LXR stimulent le TICE

Pour rappel, l'activation du récepteur nucléaire LXR réduit l'absorption intestinale du cholestérol, stimule le RCT et l'excrétion biliaire et augmente l'excrétion fécale des stérols neutres (Cf. § 2.1.2.3 et 2.3.4.1). En plus de ces effets, Van der Veen *et al.* ont montré en 2009 que l'activation de LXR stimule le TICE [348], comme cela avait été suggéré par Kruit *et al.* en 2005 [52]. Ainsi, lorsque la voie du TICE est activée par des agonistes de LXR, l'excrétion fécale de cholestérol est multipliée par 3, la contribution relative du TICE passant de 33% à 63% [348]. L'excrétion biliaire est doublée suite au traitement par le T0901317.

2.4.4.3.2 Les agonistes de PPAR delta stimulent le TICE

L'activation de PPAR δ par un agoniste spécifique stimule le RCT sans induire de modification de l'excrétion biliaire du cholestérol [305][368][76]. Sur ce, Vrins *et al.* ont montré que l'activation de PPAR δ induisait une augmentation de l'excrétion transintestinale du cholestérol [354]. Des souris traitées avec un agoniste synthétique spécifique de PPAR δ , le GW610742, présentent une excrétion fécale de cholestérol triplée alors même que l'excrétion biliaire de cholestérol est inchangée par rapport aux souris contrôles. La mesure du TICE chez ces animaux permet de mettre en évidence que cette voie est largement augmentée (+66%) par un traitement avec le GW610742. Ce résultat renforce le lien entre le TICE et le métabolisme des acides gras puisque les acides gras polyinsaturés sont des ligands naturels de ce membre de la famille des récepteurs nucléaires [369]. L'analyse de l'expression des gènes au niveau intestinal chez les souris traitées avec l'agoniste montre une régulation positive d'ABCA1 et d'ABCG8 qui sont impliqués dans l'efflux du cholestérol et une régulation négative de NPC1L1.

2.4.4.3.3 L'ézétimibe

Bien que les résultats obtenus par Jakulj *et al.* sur l'implication de l'ézétimibe dans le TICE nécessitent d'être confirmés et approfondis (Cf. § 2.4.3.4.1), il semblerait que cet agent pharmacologique potentialise le TICE [363].

2.4.4.3.4 Les statines

Les statines (Cf. § 2.1.1 et § 2.2.2.2) sont des molécules pharmaceutiques largement utilisées en clinique pour réduire la cholestérolémie. Le mode d'action des statines passe par une inhibition de l'HMG-CoA réductase qui est l'enzyme limitante de la synthèse endogène du cholestérol et par une stimulation de la voie SRBP2. Lorsque j'ai commencé ma thèse, l'effet des statines sur le TICE était inconnu. J'ai étudié leur impact sur cette voie lors de mon travail de doctorat.

2.4.5 Contribution relative de la voie biliaire et non biliaire dans le RCT

L'excrétion biliaire est classiquement décrite comme étant la seule voie d'élimination du cholestérol via le RCT [370]. Depuis maintenant plus de 5 ans, il a été rapporté qu'une voie non biliaire contribue à l'excrétion des stérols neutres de l'organisme : le TICE [14][52]. Différentes équipes de recherche ont alors cherché à comprendre l'importance relative de la voie biliaire et de la voie transintestinale dans le RCT (**figure 20**). Avec des modèles différents, deux équipes reportent des résultats opposés quant à l'implication du TICE dans le RCT. Via un modèle chirurgical de ligature du canal biliaire ou via un modèle de souris non cholestatique, déficient pour le transporteur ABCB4, Nijstad *et al.* montrent que le RCT est très fortement diminué au niveau des stérols neutres présents dans les fèces [371]. On n'observe pas chez ces souris de compensation par une augmentation de la synthèse et de la sécrétion des AB. Nijstad *et al.* reportent également que la stimulation du RCT chez les souris déficientes en ABCB4 via l'activation de LXR dépend majoritairement d'une excrétion biliaire fonctionnelle [371]. Une excrétion biliaire fonctionnelle semble donc indispensable dans ces modèles pour que le RCT le soit aussi. Dans cette étude, la composition biliaire est modifiée or, le mélange PL/BS joue un rôle dans le TICE [14]. Afin d'apporter leur contribution à la compréhension de cette nouvelle voie métabolique, Temel *et al.* ont mis au point un modèle de souris transgénique exprimant la forme humaine du transporteur NPC1L1 au niveau du foie. Ces souris présentent une quasi absence de cholestérol dans la bile (>90%), due à une réabsorption presque complète du cholestérol biliaire par le transporteur NPC1L1 au niveau des canalicules biliaires hépatiques. A noter, les souris transgéniques NPC1L1 ne compensent pas par une augmentation de la synthèse ou de la sécrétion des acides biliaires dans les fèces. Chez ces souris, leurs mesures montrent que le RCT des macrophages est normal, de même que la quantité des stérols neutres dans les fèces [372]. Aussi, on retrouve chez ces souris l'effet potentialisateur d'un traitement avec un agoniste de LXR sur le RCT des macrophages. Temel *et al.* ont également développé un modèle chirurgical pour valider leur résultat. Chez des animaux présentant une dérivation du canal biliaire, empêchant par conséquent l'efflux de la bile dans l'intestin, le RCT issu des macrophages est maintenu. Dans leurs modèles d'étude, il semble que le RCT des macrophages est fonctionnel et ne nécessite pas de sécrétion biliaire, remettant ainsi en cause le rôle obligatoire de la bile dans le RCT. Dans ce contexte, une étude parue cette année apporte sa contribution au

débat. Xie *et al.* ont mesuré le RCT des macrophages chez des animaux issus du croisement de souris déficientes pour NPC1L1 avec les souris foie transgéniques NPC1L1 produites par Liqing Yu. Ces souris se caractérisent par une réduction importante de l'excrétion biliaire et de l'absorption intestinale du cholestérol sans modification de la sécrétion des acides biliaires. Les résultats obtenus montrent que ces souris ont un RCT des macrophages réduit de 60% [373]. Un traitement à l'ézétimibe chez ces animaux restaure l'excrétion biliaire du cholestérol et le RCT des macrophages à des niveaux comparables à ceux observés chez des souris déficientes en NPC1L1. Ces résultats obtenus dans un modèle de non absorption intestinale du cholestérol viennent appuyer ceux précédemment obtenus par Nijstad *et al.*, limitant la part du TICE dans le RCT. Le débat reste donc largement ouvert quant à l'implication du TICE dans le RCT.

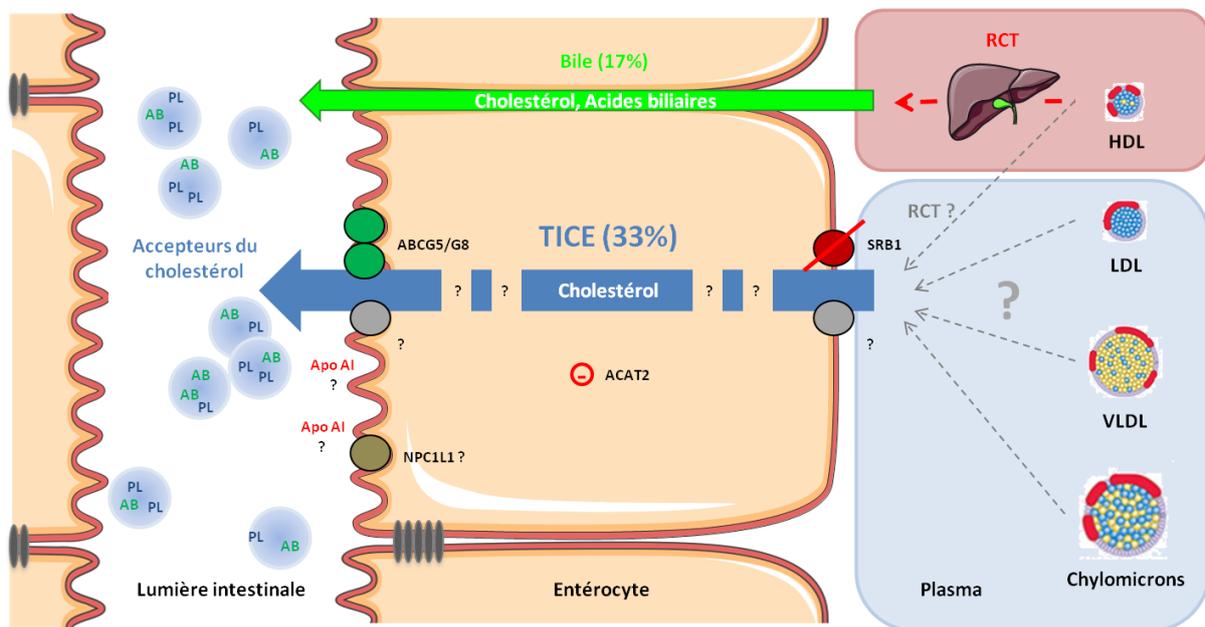


Figure 20. Schéma récapitulatif des voies d'élimination du cholestérol : voie biliaire et voie du TICE

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Le TICE est une voie non biliaire d'élimination du cholestérol qui a été mise à jour en 2007 [14] et qui pourrait être décrit comme le processus inverse de l'absorption du cholestérol au niveau intestinal. Le cholestérol du compartiment plasmatique est transporté, à travers la muqueuse vers la lumière intestinale. L'intérêt porté par la communauté scientifique et l'industrie pharmaceutique à cette voie est grandissant. Cependant, peu d'études sont encore disponibles et les mécanismes moléculaires du TICE demeurent mal caractérisés. Chez la souris, on sait que le TICE est maximal au niveau de la partie proximale de l'intestin [14] et qu'il représente 33% de l'excrétion fécale du cholestérol, ce qui est deux fois supérieur à la voie biliaire [52]. Le TICE est potentialisé par la présence d'accepteurs de cholestérol dans la lumière intestinale [14]. De façon très importante, cette voie est inductible. Par exemple, l'état nutritionnel, des régimes alimentaires, des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR δ et LXR vont stimuler le TICE [366][348][354][14]. Néanmoins tous ces modèles augmentent la cholestérolémie, et il n'y pas encore eu d'études retrouvant une augmentation du TICE associée à une baisse des niveaux plasmatiques de cholestérol. Au niveau moléculaire, l'implication de l'hétérodimère ABCG5/G8, présent au sein de la membrane apicale des entérocytes et permettant l'efflux du cholestérol du compartiment cellulaire vers la lumière intestinale, semble validée [348]. Si SRB1 est impliquée dans le TICE, sa contribution semble mineure et non limitante [351, p. 201]. L'implication de NPC1L1 et d'ABCA1 reste plus floue [363][350]. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'apporter une base moléculaire à la compréhension de cette nouvelle voie métabolique du TICE en répondant notamment aux questions suivantes (**figure 21**) :

1. Quelle est l'origine du cholestérol excrété par la voie transintestinale ?
2. Quels sont les transporteurs impliqués dans le captage et l'efflux du cholestérol au niveau des membranes basolatérale et apicale des entérocytes ?
3. Modularité du TICE : quel est l'effet de molécules endogènes, de composés naturels ou drogues hypocholestérolémiantes sur le TICE ?
4. Le TICE existe-t-il chez l'homme ?

Le premier objectif de ma thèse a été de déterminer l'origine du cholestérol excrété par la voie du TICE en testant l'implication des lipoprotéines de type LDL et HDL. Le radiomarquage des particules m'a permis de déterminer de manière directe *in vivo* et *ex vivo* leur implication dans le TICE.

Le deuxième objectif a été l'identification des récepteurs présents au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes qui permettent la captation du cholestérol pour le TICE. Mon objectif a été de vérifier si le récepteur aux LDL est impliqué dans cette voie métabolique. Pour ce faire, j'ai d'abord mesuré le TICE chez des souris déficientes en PCSK9 qui surexpriment le LDLR au niveau de l'intestin grêle [160], les souris déficientes en PCSK9 puis chez des souris LDLR KO. Au sein de la membrane apicale, je me suis intéressé à l'identification des transporteurs qui peuvent induire l'efflux du cholestérol par la voie du TICE. L'hétérodimère ABCG5/G8 assure au moins 40% de l'efflux du cholestérol dans la lumière intestinale [348], 60% est donc éliminé via d'autres mécanismes.

Le troisième objectif de ma thèse a été l'identification de modulateurs du TICE. Notamment, comment des composés endogènes tel que PCSK9 et des composés pharmacologiques largement prescrit en clinique tels que

les statines peuvent réguler le TICE ? J'ai également étudié l'effet de composés naturels sur le TICE, tels que la diosgénine connue pour ses propriétés hypocholestérolémiantes, dans le but d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires du TICE.

Enfin, mon quatrième objectif a été de déterminer si le TICE était présent et inducible *ex vivo* chez l'homme sur des explants intestinaux mis en contact de lipoprotéines marquées au cholestérol tritié.

Afin de répondre à ces questions, j'ai principalement utilisé deux approches complémentaires : une approche directe, *in vivo*, par une technique de cannulation et de perfusion intestinale et une approche *ex vivo* par l'utilisation d'explants intestinaux issus de souris génétiquement modifiées ou issus de biopsies intestinales humaines, montés en chambres de Ussing.

In fine, mon travail de thèse vise à fournir de nouvelles bases moléculaires pour la compréhension du TICE et de sa régulation.

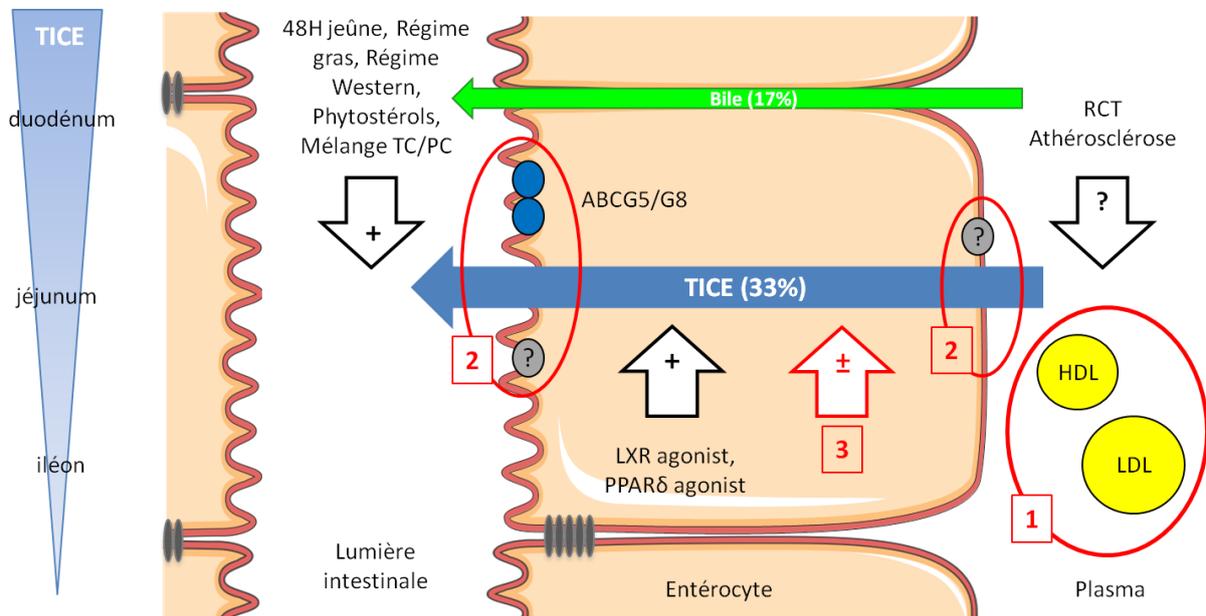


Figure 21. Schéma récapitulatif des acteurs et modulateurs connus de l'excrétion transintestinale du cholestérol et des objectifs de mon travail de thèse (de 1 à 3, détaillé dans le texte)

ARTICLE 1

L'EXCRETION TRANSINTESTINALE DU CHOLESTEROL EST UN PROCESSUS METABOLIQUE ACTIF IMPLIQUANT LE LDLR, PCSK9 ET LE TRANSPORTEUR ABCB1.

L'excrétion transintestinale de cholestérol (TICE) est une nouvelle voie d'élimination du cholestérol plasmatique, complémentaire de la voie hépatobiliaire *classique*, mais qui reste mal caractérisée.

Notre objectif est d'identifier de nouveaux déterminants moléculaires du TICE. Nous nous sommes posés les questions de l'origine du cholestérol excrété, de l'importance fonctionnelle dans le TICE du récepteur aux LDL (LDLR), de son inhibiteur physiologique, la proprotéine convertase subtilisin kinase de type 9 (PCSK9) et du transporteur ABCB1 (cholesterol floppase). Ex vivo à l'aide d'explants intestinaux montés en chambres de Ussing ou *in vivo* par perfusion intestinale chez des souris présentant une dérivation biliaire, nous avons mesuré le passage transintestinal de cholestérol tritié.

Nous observons pour la première fois le TICE chez l'homme de façon directe, sur des explants jéjunaux humains issus de chirurgie bariatrique. Le TICE y est modulable par des accepteurs du cholestérol et aussi bien les LDL que les HDL fournissent du cholestérol au TICE *ex vivo* chez l'homme mais également *in vivo* et *ex vivo* chez la souris. Le TICE est fortement inhibé à 4°C et en absence d'oxygène sur des explants de souris C57Bl/6. Le LDL-TICE est augmenté de 62% ($p < 0.01$) *in vivo* et de 103% ($p < 0.05$) *ex vivo* chez des souris déficientes pour PCSK9 qui se caractérisent par une quantité accrue de LDLR au niveau intestinal (~+300%). La dégradation en aigu du LDLR induite par une injection intraveineuse de PCSK9 recombinante conduit à une baisse de 35% ($p < 0.05$) du TICE chez les souris déficientes en PCSK9 mais est sans effet sur des souris déficientes en LDLR. La réduction du TICE est consécutive à la dégradation en aigu du LDLR bien que ce récepteur ne soit pas limitant pour cette voie métabolique. En effet, *in vivo* et *ex vivo*, le TICE tend à être augmenté chez les souris déficientes en LDLR par rapport à des souris sauvages C57Bl/6. Des souris sauvages C57Bl/6 nourries pendant 10 jours avec un régime enrichi en lovastatine 0.02% (wt/wt) ont un LDL-TICE 71% ($p < 0.05$) plus élevé que des souris sous régime contrôle. En revanche, la lovastatine ne stimule pas le TICE chez les souris LDR KO. Nous montrons enfin qu'*in vivo*, le TICE est réduit de 26% ($p < 0.05$) chez des souris déficientes pour le transporteur apical ABCB1. Ex vivo, l'inhibition pharmacologique d'ABCB1 réduit significativement le TICE des souris contrôles (FVB) mais n'affecte pas les souris déficientes pour ABCB1.

Nos travaux ont permis d'identifier de nouveaux déterminants moléculaires du TICE : les LDL et HDL, ABCB1 au niveau apical et le LDLR au niveau basolatéral. PCSK9 et la lovastatine régulent le TICE de façon opposée via un mécanisme dépendant du LDLR. De plus, sur des explants jéjunaux humains, le TICE est effectif et inductible.

Transintestinal Cholesterol Excretion Is an Active Metabolic Process Modulated by PCSK9 and Statin Involving ABCB1

Cédric Le May,* Jean Mathieu Berger,* Anne Lespine, Bruno Pillot, Xavier Prieur, Eric Letessier, M. Mahmood Hussain, Xavier Collet, Bertrand Cariou, Philippe Costet

Objective—Transintestinal cholesterol excretion (TICE) is an alternate pathway to hepatobiliary secretion. Our study aimed at identifying molecular mechanisms of TICE.

Approach and Results—We studied TICE *ex vivo* in mouse and human intestinal explants, and *in vivo* after bile diversion and intestinal cannulation in mice. We provide the first evidence that both low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein deliver cholesterol for TICE in human and mouse jejunal explants at the basolateral side. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9)^{−/−} mice and intestinal explants show increased LDL-TICE, and acute injection of PCSK9 decreases TICE *in vivo*, suggesting that PCSK9 is a repressor of TICE. The acute repression was dependent on the LDL receptor (LDLR). Further, TICE was increased when mice were treated with Lovastatin. These data point to an important role for LDLR in TICE. However, LDLR^{−/−} mice showed increased intestinal LDL uptake, contrary to what is observed in the liver, and tended to have higher TICE. We interpret these data to suggest that there might be at least 2 mechanisms contributing to TICE; 1 involving LDL receptors and other unidentified mechanisms. Acute modulation of LDLR affects TICE, but chronic deficiency is compensated for most likely by the upregulation of the unknown mechanisms. Using mice deficient for apical multidrug active transporter ATP-binding cassette transporter B1 a and b, and its inhibitor, we show that these apical transporters contribute significantly to TICE.

Conclusions—TICE is operative in human jejunal explants. It is a metabolically active process that can be acutely regulated, inversely related to cholesterolemia, and pharmacologically activated by statins. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:1484-1493.)

Key Words: ATP-binding cassette transporter B1 ■ lipoprotein ■ low-density lipoprotein receptor ■ PCSK9 ■ transintestinal cholesterol excretion

Excess cholesterol must be eliminated from the body to avoid its accumulation in tissues and to prevent or diminish atherosclerosis. The hepatobiliary pathway has been considered as the major cholesterol elimination route. Nevertheless, the existence of a nonbiliary route contributing to fecal sterol loss was revealed decades ago in dogs,¹ rats,² and later in humans³ with impaired biliary secretion. More recently, a normal fecal cholesterol excretion rate was observed in mice deficient for cholesterol biliary excretion attributable to the absence of the canalicular phospholipid transport multidrug resistance 2 or to the overexpression of hepatic Niemann-Pick C1-Like 1.^{4,5} Normal or lower biliary cholesterol excretion and increased fecal sterol loss were also observed in mice with no or dramatically less liver cholesterol esterification by the enzyme acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase 2.⁶ Transintestinal

cholesterol excretion (TICE) is now recognized as a significant alternative route to the hepatobiliary pathway.⁷ It has been estimated that TICE represents constitutively 33% of total fecal sterol loss in mice.⁸ More recently, Temel et al⁹ showed that TICE is essential to macrophage reverse cholesterol transport in mice suggesting a potential antiatherogenic role for TICE. Intestinal cholesterol excretion is inducible nutritionally by a high-fat diet⁹ or pharmacologically by ligands of liver X receptor⁸ or peroxisome proliferator activated receptor- δ ,¹⁰ but the molecular mechanisms remain unknown.

See accompanying article on page 1452

Several receptors mediate hepatobiliary cholesterol elimination. Hepatic low-density lipoprotein receptor (LDLR) plays a major role in the classic hepatobiliary route and clears

Received on August 6, 2012; final version accepted on March 19, 2013.

From the INSERM, UMR 1087, CNRS UMR 6291, Nantes, F-44000 France (C.L.M., J.M.B., B.P., X.P., B.C., P.C.); UMR1331, TOXALIM, INRA, INP, UPS, Toulouse, France (A.L.); Université de Nantes, Nantes, F-44035 France (X.P., B.C.); Department of Endocrine and Visceral Surgery, University Hospital of Nantes, France (E.L.); Department of Cell Biology, SUNY Downstate Medical Center, Brooklyn, NY (M.M.H.); INSERM UMR 1048, Toulouse, France (X.C.); Institut de Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, UPS/INSERM, Toulouse, France (X.C.); and Department of Endocrinology, University Hospital of Nantes, France (B.C.). P.C. is currently affiliated with the Department of Cell Biology, SUNY Downstate Medical Center, Brooklyn, NY.

*These authors contributed equally.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvbahaajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.112.300263/-/DC1>.

Correspondence to Philippe Costet, INSERM UMR-S 1087, l'Institut du thorax, 8 Quai Moncousu, BP 70721, 44007, Nantes, France (e-mail philippe.costet@univ-nantes.fr); or Cédric Le May, INSERM UMR-S 1087, l'Institut du thorax, 8 Quai Moncousu, BP 70721, 44007, Nantes, France (e-mail cedric.lemay@univ-nantes.fr).

© 2013 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvbahaajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300263

plasma cholesterol through the endocytosis of apolipoprotein (apo) B-containing LDL¹¹ particles or apoE-coated lipoproteins, such as large high-density lipoprotein (HDL) or chylomicrons and very low-density lipoprotein remnants. Another important receptor, scavenger receptor B1, binds preferentially to apoAI and mediates the selective uptake of esterified cholesterol from HDL.¹² Scavenger receptor B1-deficient mice present with increased TICE.⁹

Beside the liver, LDLR is expressed in many tissues, including the intestine where it is localized on the basolateral side of enterocytes.¹³ Experiments in rats infused with LDL showed that intestinal LDLR mediates 60% of the LDL uptake.¹⁴ In the liver and in the intestine, the quantity of cell surface LDLR results from a balance between its synthesis and degradation. Cellular cholesterol depletion and cholesterol synthesis inhibitors like statins increase the LDLR transcription via the activation of the sterol response element binding protein 2 pathway.¹⁵ Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) induces the LDLR degradation because it binds to the extracellular domain of the LDLR and prevents its recycling to the cell surface.¹⁵ Thus, mice deficient in PCSK9 have more LDLR protein in the liver¹⁶ and in the intestine.¹⁷ The functional importance of intestinal LDLR and its circulating regulator PCSK9 in TICE remains to be explored.

Efflux of free cholesterol from the apical side of the enterocytes mainly takes place via ATP-binding cassette transporter G5/ATP-binding cassette transporter G8 (ABCG5/G8).¹⁸ TICE is reduced by only 40% in ABCG5-deficient mice,⁹ suggesting that TICE-derived cholesterol exit enterocytes via other cholesterol transporters. P-Glycoprotein (P-gp; multidrug resistance-1 [MDR1]) or ATP-binding cassette transporter B1 (ABCB1) belonging to the ATP-binding cassette family is an integral membrane protein expressed in most epithelial cells, notably in the liver and at the apical side of enterocytes. It exports a large variety of structurally unrelated compounds out of cells and out of organisms protecting tissues from xenobiotic toxicity.¹⁹ ABCB1 is also involved in the movement of endogenous molecules, such as cholesterol, phospholipids, and sphingolipids,²⁰ and a variety of steroids.²¹ Although its role in cholesterol efflux per se remains controversial,²² it has been shown that ABCB1 contributes to cholesterol distribution from the cytosolic leaflet to the exoplasmic leaflet of the plasma membrane by acting as a floppase.²³

Although the existence of TICE per se is not debated, the nature of the phenomenon remains unclear. The main missing elements are (1) a molecular mechanism for cholesterol entry on the basal side of enterocytes; (2) a direct evidence of TICE in intestinal explants, in particular, in human tissues; (3) data showing an increase of TICE in the context of lower cholesterolemia; (4) the contribution of apical transporters; and (5) acute modulation of TICE. The present study was developed to fill these gaps.

Material and Methods

Material and Methods are available in the online-only Supplement.

Results

TICE Is an Active Metabolic Process

To develop an *ex vivo* assay for TICE, we mounted mouse duodenal explants in Ussing chambers and added LDL (0.7

mg/mL) radiolabeled with ³H-free cholesterol (³H-LDL) to the basolateral side of duodenal mouse explants and incubated at 37°C or 4°C. After 30 minutes and at 37°C, 0.07% of the initial dose of ³H-cholesterol present in the basal chamber was collected into the apical chamber. We determined the passage of cholesterol to the apical chamber >90 minutes (3×30 minutes), and the radioactive content remained in the explants at the end of the experiment. We verified that TICE and ³H-cholesterol intestinal content values were stable over the first, the second, and the last period of 30-minute measurement (data not shown). ³H-LDL TICE (Figure 1A) and uptake (Figure 1B) were repressed by cold temperatures. Next, we measured TICE from ³H-LDL in explants over 3 consecutive periods of 30 minutes in the presence or absence of oxygen in the media (Figure 1C); TICE was observed when media were oxygenated. In group C, oxygenation-induced TICE is stronger when the oxygenated period is consecutive to a 30-minute phase without oxygen. This could be attributable to cells being loaded with cholesterol during the nonoxygenated period. This might mean that oxygen is important to cholesterol efflux. As a control, we verified that bubbling of N₂ instead of oxygen had no effect on TICE (data not shown). TICE was not secondary to cytotoxicity as there was no significant increase in lactate dehydrogenase under different conditions (Figure 1D). Next we measured the impact on TICE of apical cholesterol acceptors present in Figure 1A–1D (Figure 1E). Removing cholesterol acceptors from the apical chamber significantly reduced TICE. No cytotoxicity associated with the presence of cholesterol acceptor was detected and, therefore, we systematically used cholesterol acceptors, unless stated. Therefore, transport of ³H-LDL cholesterol is attributable to an active metabolic pathway when explants were provided with oxygenated media at 37°C. To our knowledge, this is the first report of a method to measure TICE *ex vivo*.

Both HDL and LDL Provide Cholesterol for TICE

To determine whether HDL and LDL contribute to TICE, we added ³H-LDL and ³H-HDL to the basolateral side of duodenal mouse explants. Comparison of TICE showed that both lipoproteins can deliver cholesterol for TICE in explants (Figure 2A). Similar results were observed when LDL and HDL were labeled with ³H-cholesteryl oleate (Figure 1A in the online-only Data Supplement). Next we measured TICE *in vivo*. Previous studies measured TICE with ³H-cholesterol diluted in intralipid.^{3,24} Here, we delivered ³H-cholesterol using lipoproteins. Bile-diverted C57Bl6/J mice were intravenously injected with ³H-cholesterol labeled LDL or HDL (1.8 mg of LDL and HDL cholesterol in a volume of 130 μL), and TICE was measured by quantifying intestinal perfusates. After injection, both plasma ³H-cholesterol and total cholesterol were increased (Figure 1B and 1D in the online-only Data Supplement) because of the accumulation of cholesterol in the LDL or the HDL fraction, as verified by fast protein liquid chromatography (Figure 1C in the online-only Data Supplement). TICE had already reached a plateau 15 minutes after injection of lipoproteins and was stable >2 hours (Figure 1E in the online-only Data Supplement). Both LDL and HDL were found to provide cholesterol for *in vivo* TICE (Figure 2B). Thus, various lipoproteins can participate in TICE.

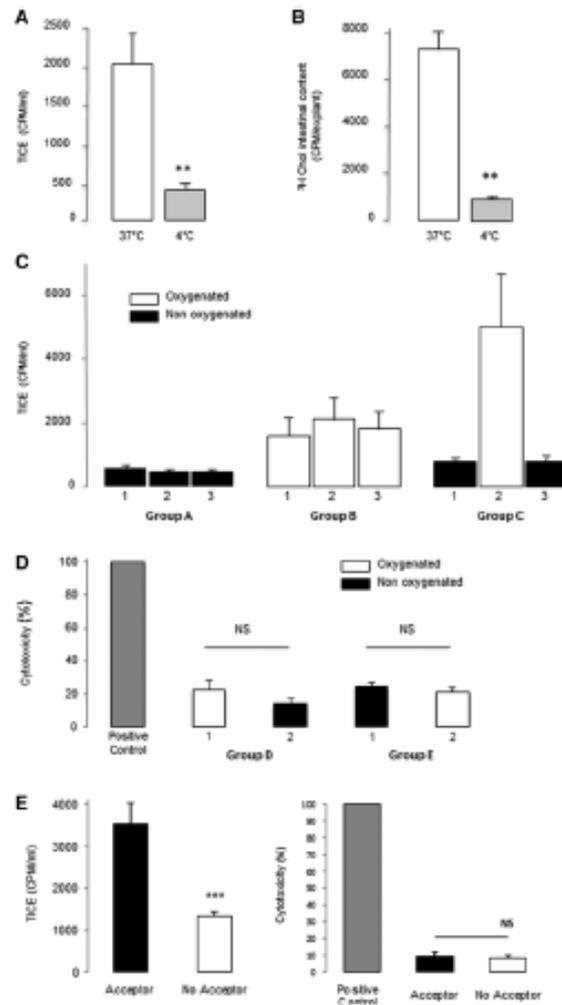


Figure 1. Transintestinal cholesterol excretion (TICE) is an active metabolic pathway. C57Bl6J mouse proximal intestinal explants were mounted on Ussing chambers. ³H-cholesterol-labeled low-density lipoprotein (LDL; ³H-LDL) was added to the Krebs/glucose buffer at the basolateral side. A, TICE was determined by measuring the appearance of radioactivity at the apical side and uptake of was measured by quantifying radioactivity in the explants incubated at 37°C or 4°C (n=8–16 explants from 4 to 8 mice per group) (B). Results represent the average of TICE measured over 3 periods of 30 minutes. C, TICE was measured at 37°C in 3 groups of C57Bl6J explants for 3 consecutive phases of 30 minutes (1, 2, 3). In group A, the buffers were not oxygenated. In group B, buffers were constantly oxygenated. In group C, buffers were oxygenated only during the second period of 30 minutes (n=8–10 explants from 8 to 10 mice per group). D, The effect of oxygenation on lactate dehydrogenase (LDH) release was measured in the apical chamber at 37°C in 2 groups of C57Bl6J explants for 2 consecutive phases of 30 minutes (4 explants per condition from 4 mice). In group D, the buffers were not oxygenated during the first 30-minute period (1) and were oxygenated for the second 30-minute period (2). In group E, explants were oxygenated for the first period but not during the second one. E, C57Bl6J mouse proximal intestinal explants were mounted on Ussing chambers. ³H-cholesterol-labeled LDL (³H-LDL) was added to the Krebs/glucose buffer at the basolateral side. TICE was determined by measuring the appearance of radioactivity at the apical side over 30 minutes during 2 consecutive conditions: with a buffer containing cholesterol acceptors (tauro-cholesta/phosphatidylcholine, 10/2 mmol/L; Black bar) or without acceptors. Cell cytotoxicity was assessed in the apical chamber during the 2 periods of 30 minutes by measuring LDH release in the apical chamber. All values represent mean±SEM. **P<0.05, ***P<0.001. For positive cytotoxic effects, explants were exposed to a cell lysis solution containing Triton-X-100. NS indicates nonsignificant.

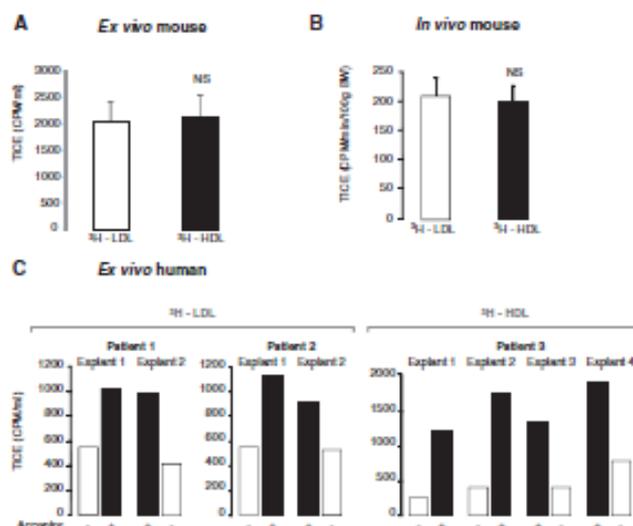


Figure 2. Both low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) contribute to transintestinal cholesterol excretion (TICE). **A**, C57Bl6J mouse proximal intestinal explants were mounted on Ussing chambers. ^3H -LDL or ^3H -HDL (specific activities of 119 CPM/nmol and 116 CPM/nmol, respectively) was added to Krebs/glucose buffer in the basolateral chamber ($n=16$ –19 explants from 10 mice per group). After 30 minutes, TICE was determined by measuring the appearance of radioactivity in the apical chamber filled with Krebs buffer enriched with cholesterol acceptors (taurocholate/phosphatidylcholine; TC/PC: 10/2 mmol/L). **B**, ^3H -LDL or ^3H -HDL (specific activities of 1494 CPM/nmol and 1088 CPM/nmol, respectively) was injected in the portal vein of C57Bl6J mice (5–8 mice per group) and transintestinal ^3H -cholesterol excretion was measured >2 hours by quantifying radioactivity in perfusates collected from cannulated intestinal segments. **C**, Jejunal explants from 3 patients were mounted on Ussing chambers. Equal amounts of ^3H -cholesterol contained in ^3H -LDL (patients 1 and 2) or ^3H -HDL (patient 3) were added to the basolateral side. Two explants were used from patients 1 and 2, and 4 explants were used from patient 3. TICE was measured over 30 minutes during 2 consecutive conditions: with a buffer containing cholesterol acceptors (white bars) or with the same buffer without cholesterol acceptor (black bars). The order of the bars from the left to the right corresponds to the order the buffers were used during the experiments. Values represent mean \pm SEM. NS indicates nonsignificant.

TICE Is Operative in Human Intestine

There has been no evidence of TICE in humans yet. Using an Ussing Chamber, we measured TICE with ^3H -LDL and ^3H -HDL in jejunal explants from 3 patients who underwent bariatric surgery (Figure 2C). Explants were collected 50 cm below duodenojejunal flexure for the all patients. We also compared TICE in the absence or in the presence of cholesterol acceptors in the apical chamber. TICE was operative in human explants. The presence of cholesterol acceptors (taurocholate/phosphatidylcholine, 10/2 mmol/L) increased TICE by roughly 100% for ^3H -LDL and 300% to 400% for ^3H -HDL. Thus, human intestine might play a role in TICE.

PCSK9 Deficiency Increases TICE

To determine whether the LDLR can contribute to TICE, we measured TICE derived from LDL in PCSK9^{-/-} mice that present with higher amounts of LDLR in their gut, as we previously showed.¹⁷ LDL-TICE was increased by 103% ($P<0.05$) in duodenal explants from PCSK9^{-/-} mice, compared with explants from PCSK9^{+/+} (Figure 3A). Next, we verified these results in vivo. PCSK9^{-/-} mice have \approx 50% less plasma cholesterol than littermates because of an increased clearance of HDL and LDL, respectively, via the apoE and apoB.¹⁴ We measured TICE with ^3H -LDL in

PCSK9^{-/-} and PCSK9^{+/+} littermates. Injection of ^3H -LDL increased plasma cholesterol in wild type (WT) and PCSK9^{-/-} mice but increases were higher in WT mice (Figure 1IA in the online-only Data Supplement). Moreover, increases in ^3H -cholesterol were similar in WT and PCSK9^{-/-} mice, but subsequent clearance was faster in PCSK9^{-/-} mice (Figure 1IB in the online-only Data Supplement). These data are consistent with observations that PCSK9^{-/-} mice clear LDL-derived ^3H -cholesterol more rapidly than control mice.¹⁶ In vivo TICE was increased by 62% ($P<0.01$) in PCSK9^{-/-} mice (Figure 3B), despite their lower plasma cholesterol levels throughout the experiment (Figure 1IA in the online-only Data Supplement). Similar results were observed with LDL labeled with ^3H -cholesteryl oleate (Figure 1IC and 1ID in the online-only Data Supplement). In accordance with increased TICE, PCSK9^{-/-} mice have increased fecal cholesterol loss, despite normal cholesterol absorption (Figure 1IC and 1ID in the online-only Data Supplement). Thus, PCSK9 deficiency increases TICE.

Acute Degradation of LDLR by PCSK9 Decreases TICE

Next we verified whether acute depletion of LDLR decreases TICE. It has been shown that injection of recombinant

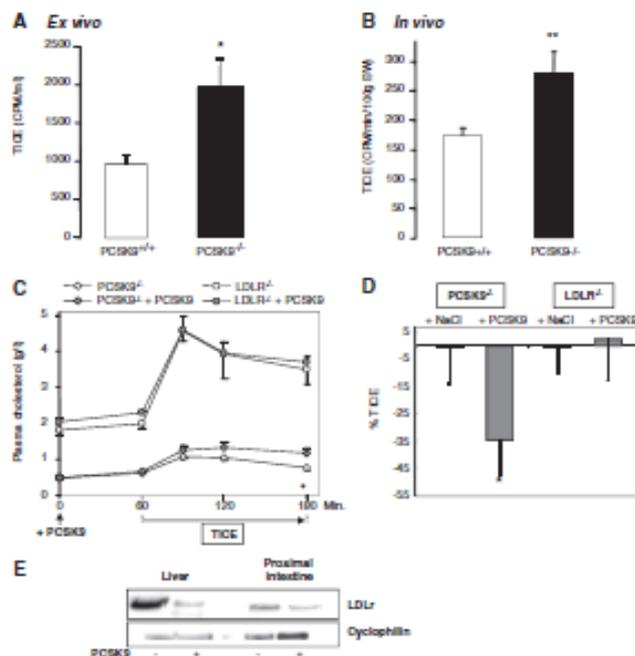


Figure 3. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) modulates transintestinal cholesterol excretion (TICE) in an low-density lipoprotein receptor (LDLR)-dependent manner. **A**, Intestinal explants from PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice were mounted in Ussing chambers and TICE measured with ³H-LDL (n=12–13 explants from 8 to 9 mice per group). **B**, TICE was measured for 2 hours in vivo (n=10–13 mice per group). **C**, Plasma cholesterol levels of PCSK9^{+/+} and LDLR^{-/-} mice. Solutions of 100 μg recombinant human PCSK9 protein or NaCl were injected at 0 minute and ³H-LDL at 60 minutes (n=6–7 mice per group). **D**, TICE was measured for 2 hours in these mice in vivo. Figure represents percentage reduction of TICE in PCSK9^{-/-} mice (left) and LDLR^{-/-} mice (right) after NaCl or PCSK9 intravenous injection. For each mouse strain, results are expressed as relative to mice injected with NaCl. **E**, Representative Western blot analysis of scraped intestinal mucosae harvested 1 hour after injection of recombinant PCSK9. Note the decrease in LDLR content in liver and intestine. Values represent mean±SEM. *P<0.05.

PCSK9 in the circulation rapidly degrades the hepatic and extrahepatic LDLR.^{25,26} We first measured TICE in PCSK9^{-/-} mice, 1 hour after they were intravenously injected with 100 μg recombinant PCSK9.²⁵ Western blot analysis showed that the LDLR content of the duodenum was reduced within 1 hour (Figure 3E). As expected, increases in cholesterol after the injection of ³H-LDL were more pronounced in mice infused with PCSK9 (Figure 3C; Figure III in the online-only Data Supplement). TICE was decreased by ≈35% in these mice (Figure 3D). As a control, PCSK9 was injected in LDLR^{-/-} mice (Figure 3C and 3D). LDLR^{-/-} mice presented with 40% higher TICE in absolute value than PCSK9^{-/-} mice (data not shown). It is unclear whether this is because of very active TICE in LDLR^{-/-} mice or to the difference in genetic background between strains. Indeed, Van der Velde et al²² showed that mice of different genetic backgrounds have different levels of TICE. Nevertheless as expected, no effect of injected PCSK9 was observed on cholesterolemia nor on TICE in LDLR^{-/-} mice. These studies show that circulating PCSK9 acutely decreases TICE in an LDLR-dependent fashion.

Statins Stimulate TICE

Next we hypothesized that cholesterol synthesis inhibitors, such as statins, that upregulate LDL receptors could stimulate TICE. To test this hypothesis, C57Bl/6J mice were given a diet containing or not 0.02% Lovastatin for 10 days. This treatment decreased cholesterolemia by ≈18% (P<0.05; Figure 4A) mainly because of a marked decrease in HDL cholesterol (Figure IVB in the online-only Data Supplement). Injection of ³H-LDL increased plasma cholesterol (Figure IVC in the online-only Data Supplement) and ³H-cholesterol (Figure IVB in the online-only Data Supplement). Lovastatin increased TICE in WT mice by 71% (P=0.02; Figure 4). Thus, TICE can be pharmacologically activated by Lovastatin.

TICE Is Increased in the Absence of LDLR

The above studies involving modulation of LDLR by PCSK9 and Lovastatin indicated that LDLR might play an important role in TICE. Therefore, we hypothesized that TICE might be significantly reduced in LDLR^{-/-} mice. Chronic LDLR deficiency results in delayed LDL plasma clearance²⁷ because of less binding of LDL particles in the liver.²⁸ To evaluate

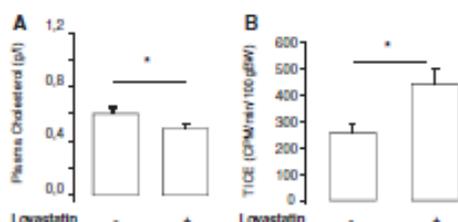


Figure 4. Transintestinal cholesterol excretion (TICE) in C57BL/6 on Lovastatin treatment. C57BL/6 mice were fed for 10 days with a regular chow diet supplemented or not with 0.2% Lovastatin (10–12 mice per group). **A**, Plasma cholesterol levels at the end of the treatment. **B**, Effect of Lovastatin on ³H-cholesterol labeled low-density lipoprotein TICE. Values represent mean±SEM. **P*<0.05.

whether TICE is affected by the absence of LDLR, we compared TICE in C57BL/6J and LDLR^{-/-} mice using ³H-LDL. In contrary to what was expected, we observed that TICE is slightly higher in LDLR^{-/-} mice than in C57BL/6 in vivo (*P*=0.055; Figure 5A; Figure V in the online-only Data Supplement). TICE also tended to be increased in LDLR^{-/-} explants (*P*=0.28; Figure 5B). In both experiments, the differences were not statistically significant but the trends were reproducible over time. To explain no reduction in TICE

in LDLR^{-/-} mice, we studied the uptake of ¹²⁵I-LDL by the various intestinal segments in C57BL/6J and LDLR^{-/-} mice after intravenous injections. Clearance from plasma was determined at various time points and radioactive content of liver and intestinal segments at 2 hours after injection; a duration equivalent to that we used for in vivo TICE (Figure 5D). We observed a delay in ¹²⁵I-LDL clearance in LDLR^{-/-} mice and a reduction of ¹²⁵I-LDL hepatic uptake (~24%; *P*<0.05) consistent with other studies.^{27,28} There was no significant difference in radioactive uptake by the medial and distal intestinal segments, but a significant increase in radioactivity was seen in the proximal segment. Thus, contrary to what occurs in the liver, chronic LDLR deficiency results in increased LDL uptake in the proximal intestine. This might contribute to increased TICE.

ABCB1 Contributes to TICE

Next we focused on molecules that could efflux cholesterol from the apical side of enterocytes. ABCG5 contributes to TICE,⁸ probably because of its important role in cholesterol efflux. However, ABCG5^{-/-} mice still have an appreciable level of TICE, suggesting that other apical transporters play a role in TICE. Among the candidates, multidrug transporter ABCB1, which is located at the apical pole of enterocyte, can act as a cholesterol floppase.²³ We recently showed that older mice deficient for both isoforms of the apical cholesterol floppase

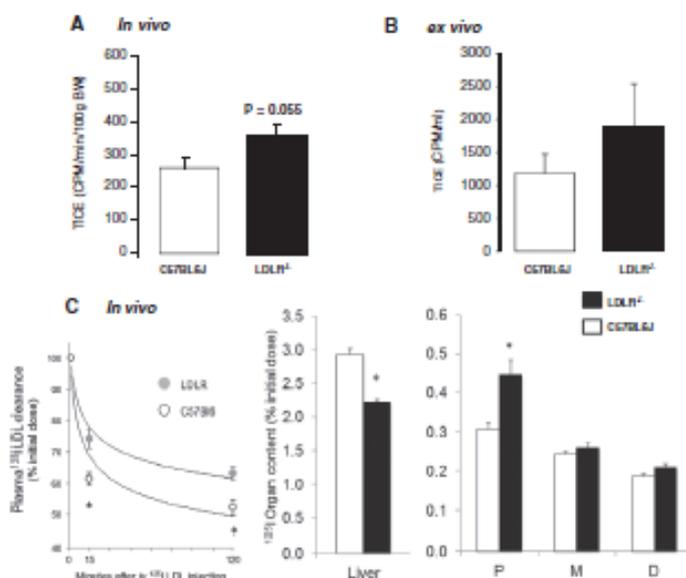


Figure 5. Transintestinal cholesterol excretion (TICE) and low-density lipoprotein (LDL) uptake in C57BL/6 and LDLR^{-/-} mice. ³H-LDL TICE in C57BL/6 and LDLR^{-/-} mice (A) in vivo (10–12 mice per group) and (B) ex vivo (n=12 mice and 16–17 explants in total for each genotype). Values represent mean±SEM. C, 12-hour-fasted male C57BL/6J or LDLR^{-/-} mice (6–7 mice per group) received intravenous injection of ¹²⁵I-LDL (10 µg; 1252 cpm/µg) and were euthanized after 120 minutes (cf. Methods in the online-only Data Supplement). Plasma content of ¹²⁵I-LDL was measured at 2, 15, and 120 minutes. ¹²⁵I radioactivity content was measured in livers and in 3 equals parts of the intestine: Proximal (P), medial (M), distal (D); histograms). Values are expressed as percentage of the dose injected. NS indicates nonsignificant; **P*<0.05; ***P*<0.01.

ABCB1a and ABCB1b (*ABCB1a/b*^{-/-}) spontaneously develop hepatic steatosis, obesity, diabetes mellitus, and increased HDL-C.²⁸ We performed our studies in 15-week-old male mice that presented with similar cholesterol levels (Figure 6A in the online-only Data Supplement), before metabolic disturbances arise. We observed that *ABCB1a/b*^{-/-} mice present with 26% less fecal cholesterol excretion ($P < 0.05$; Figure 6A). Next, we injected intravenously ³H-cholesterol diluted in endolipid to measure TICE in control *Fv-P* allele for sensitivity to the B strain of Friend leukemia virus (FVB) and *ABCB1a/b*^{-/-} mice. Increases and subsequent decays of cholesterol were similar in WT and in *ABCB1a/b*^{-/-} mice (Figure 6B in the online-only Data Supplement). TICE was decreased by 26.5% ($P < 0.05$) in *ABCB1a/b*^{-/-} mice (Figure 6B). We further verified involvement of ABCB1a/b in TICE using pharmacological inhibitors (Figure 6C). We added ABCB1 reference inhibitor PSC-833³⁰ to the apical chamber. Thirty minutes after the addition of ³H-cholesterol/endolipid to the basal chamber, the medium was collected in the apical chamber for determination of ³H-cholesterol level (initial TICE). The apical chamber was rinsed and PSC-833 was added with new medium for 30 minutes. TICE observed with no inhibitor was arbitrarily set at 1. PSC-833 inhibited TICE by 50% to 64% ($P < 0.05$) in control mice but had no effect in *ABCB1a/b*^{-/-} mice. These studies provide evidence that ABCB1a/b contribute to TICE.

Discussion

These results fill a gap in our understanding of plasma cholesterol excretion by the small intestine. We demonstrate that

both LDL and HDL provide cholesterol for TICE in vivo and ex vivo in mice. Further, we provide the first direct evidence that human intestinal explants can excrete plasma-derived LDL or HDL cholesterol. On the basis of these studies, we propose a model (Figure 7) in which both LDL and HDL can contribute to TICE, a metabolically active pathway present in mice and humans. LDL-TICE can be modulated positively by statins and negatively by PCSK9. In addition, the multi-drug transporter ABCB1 contributes to the luminal efflux of cholesterol.

TICE has generally been studied by injecting ³H-cholesterol as part of intralipid emulsions. Our studies demonstrate that cholesterol present as part of plasma lipoproteins is amenable to TICE. How do these lipoproteins contribute to TICE? Studies in mice deficient for hepatic acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2,⁶ where hepatic cholesterol cannot be esterified and stored, and recent findings in mice with impaired hepatobiliary cholesterol excretion⁹ suggest that cholesterol is first delivered to the liver before being rerouted to the intestine for excretion. Our findings do not exclude this possibility. However, our ex vivo experiments reveal that LDL and HDL can directly provide cholesterol to the intestine for TICE. While this article was in preparation, Vratsis et al³¹ published a study stating that TICE is not mediated by HDL. Overall, the main point of this article is that TICE derived from radiolabeled HDL is much lower than TICE measured after injection of ³H-cholesterol diluted in a mixture of lipids. In particular, HDL-derived TICE seems to be roughly 10x lower than biliary cholesterol excretion. For comparison, the authors

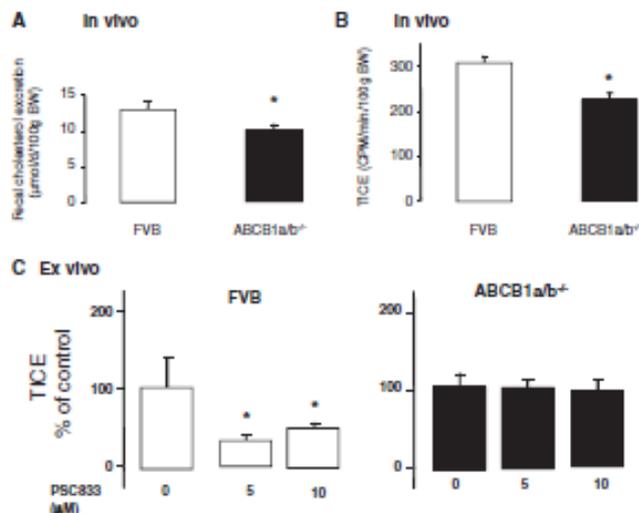


Figure 6. ABCB1 cholesterol floppase contributes to transintestinal cholesterol excretion (TICE). **A**, Fecal cholesterol excretion was measured in 15-week-old *Fv-P* allele for sensitivity to the B strain of Friend leukemia virus (FVB) control and *ABCB1a/b* male mice ($n = 7-8$ per group). **B**, TICE was measured in these animals after injecting 3.5 μ Ci ³H-cholesterol diluted in 20% endolipid. **C**, TICE was measured in explants from mice of the same age and sex ($n = 6$ explants per condition from 6 mice). ³H-cholesterol diluted in endolipid was added to the basal chamber to determine initial TICE for 30 minutes. Apical media was switched to new media with the same composition or containing ABCB1a/b inhibitor PSC-833, and TICE was measured after 30 minutes. The results represent the mean of TICE for each genotype, relative to control (no PSC-833) arbitrarily set at 1. Values represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

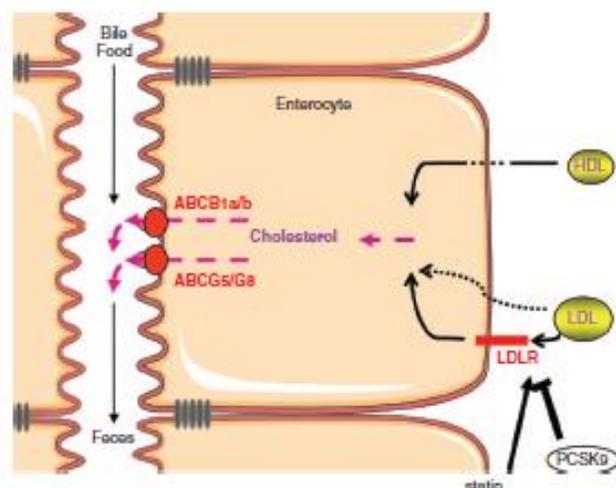


Figure 7. Model transintestinal cholesterol excretion (TICE) is an active metabolic pathway that involves both low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL). On the basal side of proximal intestine enterocytes, LDL-mediated TICE is induced by statins. TICE is repressed by proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) in an LDLR fashion, but LDL-mediated TICE is present in LDLR-deficient mice suggesting that undefined alternative pathway exists. The HDL receptor(s) responsible of the HDL-mediated TICE remain(s) to be determined. On the apical side, efflux of cholesterol is mediated at least by ATP-binding cassette transporter G5/ATP-binding cassette transporter G8 (ABCG5/G8)⁶ and ABCB1a/b.

determined that lipid emulsions contribute twice as much to TICE compared with biliary excretion. Specific activity in the bile was also 10x lower when using HDL, compared with lipid emulsions, but the doses of ³H-CO injected were 5x lower. Further, HDL-TICE was actually measurable and unfortunately no other lipoproteins, such as LDL, were used for comparison. Thus, we believe that under the experimental conditions used by these investigators, HDL is much less efficient than intralipid.

In this study, we used LDL and HDL. The importance of triglyceride-rich lipoproteins or remnants in TICE was not explored here. A study suggested that triglyceride-rich emulsion particles are not cleared directly by the small intestine but are rapidly taken in by the liver.⁹ Cholesterol is then secreted into the plasma mainly on HDL.³¹ More experiments are required to address the role of larger triglyceride-rich lipoproteins in TICE.

Using a genetic model (PCSK9^{-/-} mice) and pharmacological treatment (Lovastatin), we showed for the first time that TICE and cholesterolemia can be inversely related. Lovastatin-treated and PCSK9^{-/-}-injected mice have low plasma cholesterol and yet show increased TICE. Thus, TICE does not seem to be a concentration-dependent passive process. This observation was further supported by ex vivo studies showing that TICE occurs at physiological temperatures and in the presence of oxygen. Therefore, TICE seems to be an active process.

We observed that Lovastatin increased LDL-derived TICE in C57Bl6J mice. The effect of Lovastatin was also investigated in parallel in LDLR^{-/-} mice and Lovastatin reproducibly failed to increase TICE in the absence of LDLR (data not

shown). However, we cannot exclude that TICE reached a plateau in LDLR^{-/-} mice under Lovastatin. Thus, more work is needed to fully understand the relevance of the modulation of LDLR to TICE.

As discussed above, our data show that modulation of LDLR expression by PCSK9 and statins affects TICE. However, we were surprised to see that TICE was not decreased in LDLR^{-/-} mice. To explain these apparently contradictory findings, we propose that uptake of LDL by the intestine that contributes to TICE might involve several mechanisms. Comodulation of LDLR and TICE by PCSK9 and statins suggests that LDLR plays a role in TICE in WT mice. However, in LDLR^{-/-} mice TICE is not reduced suggesting that other unknown mechanism(s) might have been upregulated to compensate for genetic deficiency of LDLR. This is consistent with the observations showing increased gastrointestinal sterol cholesterol excretion in patients with homozygous familial hypercholesterolemia and bile diversion.³ The nature of this unknown mechanism(s) remains to be elucidated. There are several possible candidates that can be tested in the future, such as LDLR-related protein 1 that is expressed in the intestine,³² the very low-density lipoprotein receptor which is also degraded by PCSK9,³³ Sortilin 1,³⁴ and proteoglycans.³⁵ Of note, although apoE receptor low-density lipoprotein receptor-related protein 1 does not clear LDL under normal conditions, LDLR^{-/-} mice do accumulate apoE in their plasma and present with apoE on LDL.^{36,37} Thus, it is possible that excess plasma apoE bound LDL after their injection in LDLR^{-/-} mice.

Besides LDL, we also show that HDL-derived cholesterol is also amenable to TICE. It is unclear yet which receptor on

the basolateral side mediates HDL-TICE. Selective uptake of cholesterol esters from HDL is made possible by scavenger receptor BI. TICE has been found to be increased or unchanged in SRB-1^{-/-} mice.³³ Another possible entry gate for HDL cholesterol in TICE could be P2Y13/ectof1-ATP synthase pathway,³⁸ although it is unclear whether this pathway is functional in the small intestine. Obviously, more work is needed to answer these questions.

Our data show that ABCB1 contributes to TICE. It is unclear why the effect seen in vivo in the absence of transporter was not more pronounced than that seen ex vivo with the inhibitor. Several human studies describe a link between cholesterol levels and *ABCB1* gene polymorphisms.³⁹⁻⁴¹ Owing to its apical location in enterocytes, it is tempting to speculate that ABCB1 could work additionally or in synergy with ABCG5/G8 transporter to manage the luminal efflux of cholesterol. It would be very interesting to characterize the effect of ABCB1 deletion/inhibition in ABCG5/G8 knockout mice. Altogether results presented here provide evidence that TICE is an active process in human and in rodent intestine. Further, we identified molecules that could participate in this process.

Acknowledgments

We are indebted to the patients who participated to this study.

Sources of Funding

This work was funded by Fondation Génavie, French Society of Nutrition (SPN), the New French Atherosclerosis Society (NSFA), and Nantes University Hospital (Grant BRD:06/8-1).

Disclosures

None.

References

- Pertsevidis D, Kirchner EH, Abrams EH Jr. Regulation of cholesterol metabolism in the dog. I. Effects of complete bile diversion and of cholesterol loading on absorption, synthesis, accumulation, and excretion rates measured during life. *J Clin Invest*. 1973;52:2353-2367.
- Randema RH, Stallaard F, Vonk RJ, Nagel GT, Neeze RA, Hellestein MK, Kuipers F. Contribution of newly synthesized cholesterol to rat plasma and bile determined by mass isotopomer distribution analysis: bile-salt flux promotes secretion of newly synthesized cholesterol into bile. *Biochem J*. 1998;329 (pt 3):699-703.
- Deckelbaum RJ, Loos RS, Small DM, Hedberg SE, Grundy SM. Failure of complete bile diversion and oral bile acid therapy in the treatment of homozygous familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 1977;296:465-470.
- Kruit JK, Pitsch T, Havinga R, Boverhof R, Groen PH, Groen AK, Kuipers F. Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology*. 2005;128:147-156.
- Tomal RE, Sawyer JK, Yu L, Lord C, Degrolamo C, McDaniel A, Marshall S, Wang N, Shah R, Rudel LL, Brown JM. Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab*. 2010;12:96-102.
- Brown JM, Bell TA III, Alger HM, Sawyer JK, Smith TL, Kelley K, Shah R, Wilson MD, Davis MA, Lee RC, Graham MJ, Crooke RM, Rudel LL. Targeted depletion of hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss. *J Biol Chem*. 2008;283:10522-10534.
- van der Velde AE, Brufau G, Groen AK. Transintestinal cholesterol efflux. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21:167-171.
- van der Veen JN, van Dijk TH, Vries CL, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K, Tietge UJ, Groen AK, Kuipers F. Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem*. 2009;284:19211-19219.
- van der Velde AE, Vries CL, van den Oever K, Soeman I, Oude Elferink RP, van Eick M, Kuipers F, Groen AK. Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:G2033-G2038.
- Vries CL, van der Velde AE, van den Oever K, Levels JH, Haat S, Oude Elferink RP, Kuipers F, Groen AK. Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2009;50:2046-2054.
- Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:431-438.
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 1996;271:518-520.
- Fong LG, Bonney R, Kosik JC, Cooper AD. Immunohistochemical localization of low density lipoprotein receptors in adrenal gland, liver, and intestine. *J Clin Invest*. 1989;84:847-856.
- Stange EF, Distachy JM. Cholesterol synthesis and low density lipoprotein uptake are regulated independently in rat small intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:5739-5743.
- Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem*. 2007;282:18602-18612.
- Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RH, Moon YA, Horton JD. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking *Pcsk9*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:5374-5379.
- Le May C, Kourimane S, Larghi C, Chéviloux M, Jary A, Comera C, Collet X, Kuipers F, Kempf M, Carou B, Costet P. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:684-690.
- Ihii DY, Labonté ED, Howles PN. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294:G839-G843.
- Chan LM, Lewis S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci*. 2004;21:25-51.
- Honig SM, Fu S, Mao X, Yopp A, Gunn MD, Randolph GJ, Bromberg JS. FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes. *J Clin Invest*. 2003;111:627-637.
- Aye JL, Singh AT, Kaslan JA. Transport of lipids by ABC proteins: interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chem Biol Interact*. 2009;180:327-339.
- Le Goff W, Settle M, Greene DJ, Morton RE, Smith JD. Reevaluation of the role of the multidrug-resistant P-glycoprotein in cellular cholesterol homeostasis. *J Lipid Res*. 2006;47:51-58.
- Garrigues A, Hicarguel AE, Orlowski S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:10347-10352.
- van der Velde AE, Vries CL, van den Oever K, Kazne C, Oude Elferink RP, Kuipers F, Groen AK. Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology*. 2007;133:967-975.
- Grofforst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J Lipid Res*. 2008;49:1303-1311.
- Schmidt RJ, Boyer TP, Berach WR, Qian YW, Lin A, Kowala M, Albern WE, Konrad RJ, Cao G. Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;370:634-640.
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 1993;92:883-893.
- Truong TQ, Azgar A, Desnizeau F, Brissonne L. Analysis of low-density lipoprotein catabolism by primary cultures of hepatic cells from normal and low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1484:307-315.
- Foucaud-Vignault M, Scayfane Z, Ménez C, Bertrand-Michel J, Martin PG, Guillou H, Collet X, Lezpine A. P-glycoprotein dysfunction contributes to hepatic steatosis and obesity in mice. *PLoS ONE*. 2011;6:e23614.

30. Qadir M, O'Loughlin KL, Fricke SM, Williamson NA, Green WR, Minkerman H, Baer MR. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2320–2326.
31. Vriens CL, Ottenhoff R, van den Oever K, de Waart DR, Kroyt JK, Zhao Y, van Berkel TJ, Havkes LM, Aerts JM, van Eick M, Remsen PC, Groen AK. Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein. *J Lipid Res*. 2012;53:2017–2023.
32. Mosestrup SK, Gleerup J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res*. 1992;269:375–382.
33. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergamini E, Marcinkiewicz J, Nasseury N, Mayor H, Nimpf J, Prat A, Seidah MG. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem*. 2008;283:2363–2372.
34. Strong A, Ding Q, Edmondson AC, et al. Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism. *J Clin Invest*. 2012;122:2807–2816.
35. Ji ZS, Saman DA, Mahley RW. Intravenous heparinase inhibits remnant lipoprotein clearance from the plasma and uptake by the liver: in vivo role of heparan sulfate proteoglycans. *J Lipid Res*. 1995;36:583–592.
36. Ishihashi S, Perrey S, Chen Z, Onga J, Shimada M, Ohashi K, Harada K, Yazaki Y, Yamada N. Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J Biol Chem*. 1996;271:22422–22427.
37. Sherna AL, Assam M, Xiao R, Ayers S, Gautier T, Guin B, Deckert V, Chevriaux A, Grober J, Le Guern N, Pais de Barros JP, Moore DD, Lagrèze L, Maillon D. Constitutive androstane receptor activation decreases plasma apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2232–2239.
38. Vantecumst P, Radokovic C, Lichtenstein I, Pota V, Champagne E, Martínez LO, Ilicio-Filipe a moonlighting protein complex and an unexpected apoA-I receptor. *World J Gastroenterol*. 2010;16:5925–5935.
39. Jousenon H, Sirt C, Bastien B, Albertini L, Astaridis C, Schmitz G, Virvikis-Siet S. Association of ABCB1 gene polymorphisms with plasma lipid and apolipoprotein concentrations in the STANISLAS cohort. *Clin Chim Acta*. 2009;403:198–202.
40. Kajinami K, Brozoscano ME, Orlovova JM, Schaefer EJ. Polymorphisms in the multidrug resistance-1 (MDR1) gene influence the response to atorvastatin treatment in a gender-specific manner. *Am J Cardiol*. 2004;93:1046–1050.
41. Rodrigues AC, Rebacchi IM, Bertolami MC, Faludi AA, Hirata MB, Hirata RD. High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent. *Rev J Med Biol Res*. 2005;38:1389–1397.

Significance

Atherosclerosis is an inflammatory disease promoted by the accumulation of cholesterol in macrophages of the arterial wall, leading to the complication of coronary heart disease, a major cause of death in westernized countries. The classic pathway of cholesterol elimination is hepatic-biliary cholesterol secretion. There is accumulating evidence that transintestinal cholesterol excretion is an alternative pathway. There is compelling evidence from population-based data and clinical trials that low-density lipoprotein-associated cholesterol reduction is an effective strategy to prevent coronary heart disease. It is unclear whether high-density lipoprotein is atheroprotective because of their role in reverse cholesterol transport, the main hypothesis, or via other properties, such as their anti-inflammatory, antioxidant actions. Here, we identified low-density lipoprotein and high-density lipoprotein direct contribution to transintestinal cholesterol excretion as well as pharmacological agents, proteins that modulate cholesterol entry at the basal side of enterocytes, and its efflux into the intestinal lumen, at the apical side.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGEND

Figure I Both LDL and HDL contribute to TICE

(A) C57Bl6J mouse proximal intestinal explants were mounted on Ussing Chambers. ^3H -cholesteryl oleate labelled LDL or HDL (^3H CO-LDL; or ^3H CO-LDL; n=14-13 explants from 7 mice per group) were added to Krebs/glucose buffer in the basolateral chamber. After 30 min, TICE was determined by measuring the appearance of radioactivity in the apical chamber filled with Krebs buffer enriched with cholesterol acceptors (taurocholate/phosphatidylcholine; TC/PC: 10/2 mM). (B-E) Both LDL and HDL provide cholesterol for TICE *in vivo*. NaCl, ^3H -LDL or ^3H -HDL were injected in the penile vein of C57Bl6 mice (6-8 mice per group) and transintestinal ^3H -cholesterol excretion (TICE) was measured over 2 hours by intestinal cannulation (cf. Figure 1C). (B) Cholesterol levels and (D) ^3H -cholesterol were measured (n= 3-4 mice per group) during the course of the experiment. (C) Cholesterol distribution in various classes of lipoproteins was determined by Fast protein liquid chromatography analysis 15 min after injection of the lipoproteins (pool of 3 mice). (E) ^3H cholesterol in fractions of perfusion solution collected every 15 minutes. NS: non significant. Results are means \pm SEM.

Figure II. PCSK9 deficiency stimulates TICE.

(A-B) PCSK9^{+/+} (n=10) and PCSK9^{-/-} (n=13) mice received an intravenous injection of ^3H -cholesterol-LDL at t = 0 min and TICE was measured over 2 hours. (A) Plasma cholesterol and (B) ^3H -cholesterol levels of PCSK9^{-/-} and PCSK9^{+/+} littermates before and after the injection. (C-D) PCSK9^{+/+} (n=6) and PCSK9^{-/-} (n=6) mice received an intravenous injection of ^3H -cholesteryl oleate-LDL at t = 0 min and TICE was measured over 2 hours. (C) Plasma ^3H -cholesteryl oleate levels and (D) TICE during the course of the experiment. (E) Fecal cholesterol output in PCSK9^{-/-} mice. Food intake, dried feces weight and fecal cholesterol output and cholesterol absorption were determined in PCSK9^{-/-} and PCSK9^{+/+} littermates (n =6 per group) over 3 days. Data represent means \pm SEM. * p<0.05.

Figure III. PCSK9 modulates TICE in an LDLR dependent manner.

PCSK9^{-/-} (n=6) and LDLR^{-/-} (n=7) mice received an intravenous injection of NaCl or 100 μg of recombinant human PCSK9 protein at t=0. Sixty minutes later, mice were injected with ^3H -LDL. Plasma ^3H -cholesterol levels in mice injected or not with PCSK9. Values represent means \pm SEM.

Figure IV. TICE in C57Bl/6J mice upon lovastatin treatment.

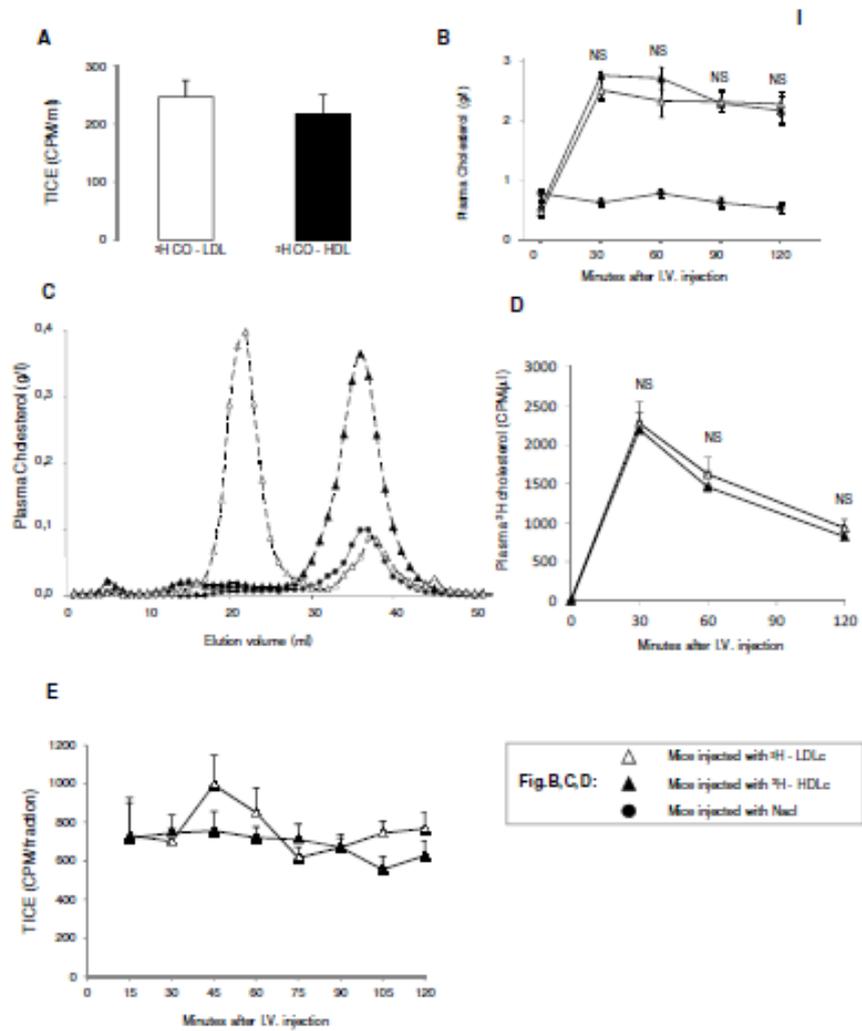
C57Bl/6J mice fed for 10 days with or without 0,2% lovastatin received an intravenous injection of ^3H -LDL at $t = 0$ min and TICE was measured over 2 hours. (A) Plasma Cholesterol (C) Cholesterol content in FPLC fractions of mouse plasma at the end of the treatment before measuring TICE (B) plasma ^3H -cholesterol during the course of the experiment ($n= 10$ -12 mice per group). Results represent means \pm SEM.

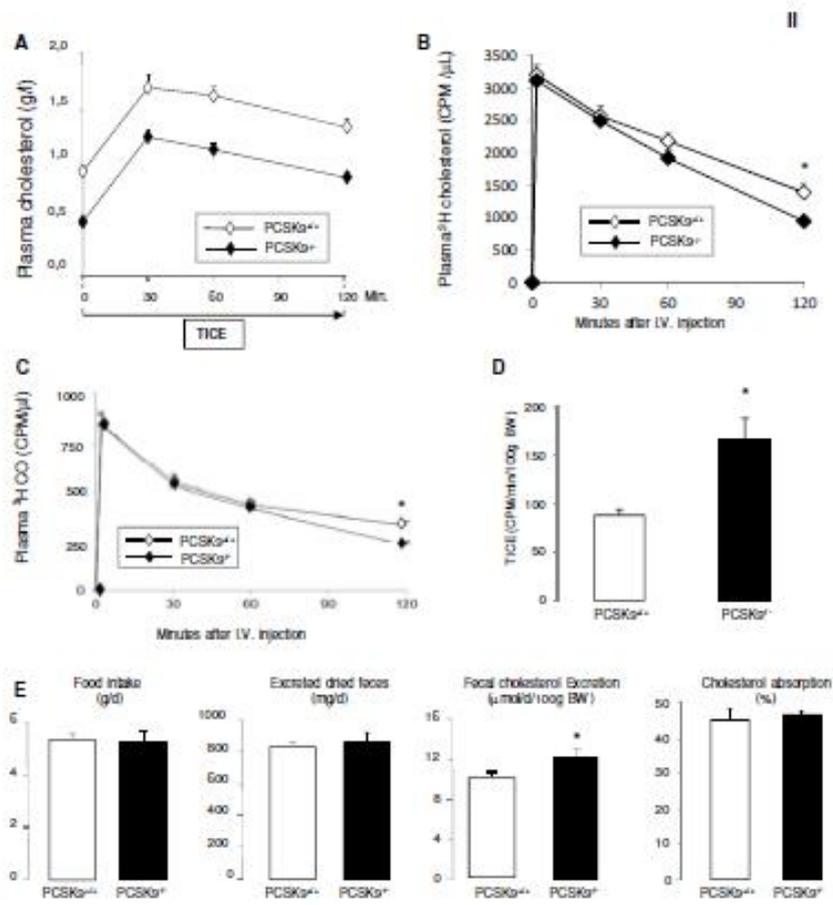
Figure V. TICE in C57Bl/6 and LDLR^{-/-} mice.

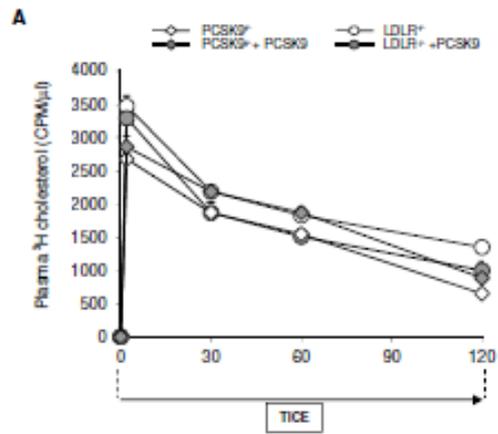
TICE was measured in vivo with ^3H -LDL in C57Bl/6J and LDLR^{-/-} mice over 2 hours. (A) Plasma Cholesterol and (B) plasma ^3H -cholesterol during the course of the experiment ($n= 10$ -12 mice per group). Results represent means \pm SEM.

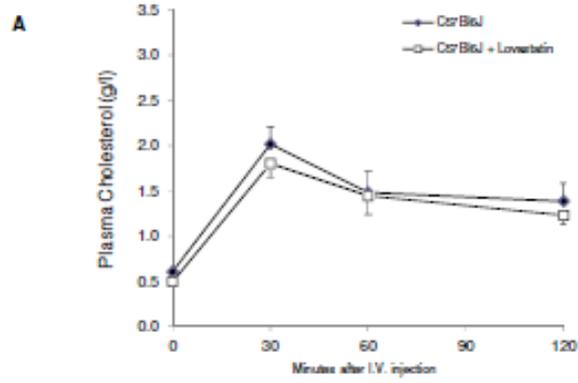
Figure VI ABCB1a/b cholesterol floppase contributes to TICE.

FVB and ABCB1a/b^{-/-} received an intravenous injection of ^3H -cholesterol diluted in endolipid at $t= 0$ min and TICE was measured over 2 hours. (A) Plasma cholesterol and (B) plasma ^3H -cholesterol during the course of the experiment ($n= 6$ mice per group). Results represent means \pm SEM.

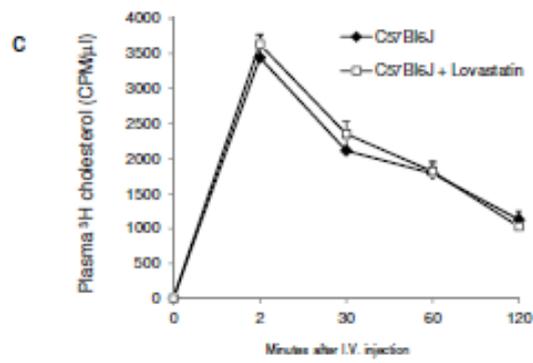
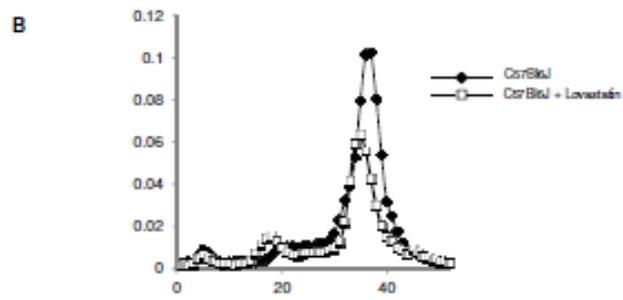




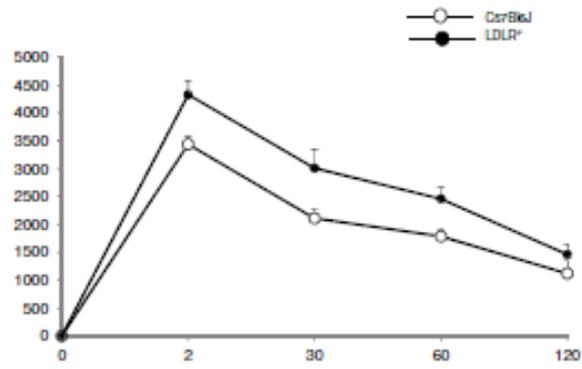
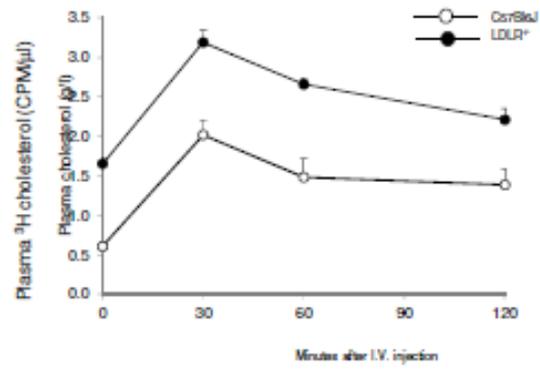




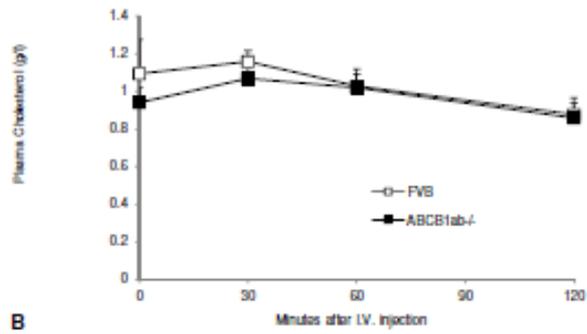
IV



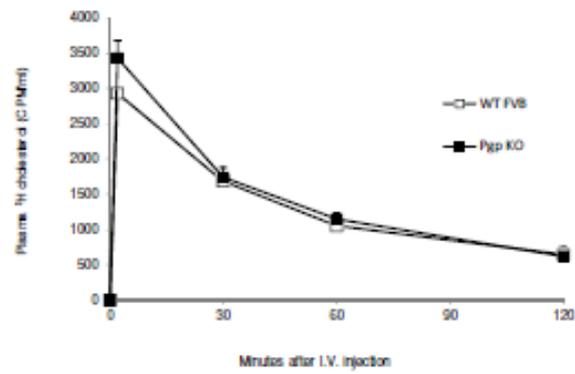
V



A



B



MATERIAL AND METHODS

Materials

Human PCSK9 recombinant protein was purchased from Cyclex (Nagano, Japan). L-phosphatidylcholine, sodium taurocholate were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). ^3H -cholesterol and ^3H -cholesteryl oleate were obtained from Perkin Elmer (France). PSC-833 was purchased from R&D System Europe (Lille, France), Endolipid 20% was provided by B. Braun Medical SA (Boulogne, France).

Animals & Diet studies

PCSK9^{-/-} and LDLR^{-/-} mice were purchased from Jackson Laboratories (Maine, USA). C57Bl6J mice were from Charles River Laboratory (l'Arbresle, France). ABCB1a/b^{-/-} and FVB control mice were purchased from TACONIC (Germantown, NY, USA). Mice had free access to food and water under a 12-hour light/12-hour dark cycle in a temperature-controlled environment. All animal studies were conducted on male mice and approved by the Ethic Committee for Animal Experimentation of Pays de la Loire. For one study, C57Bl6J and LDLR^{-/-} mice were fed *ad libitum* a regular chow diet (Safe A03 diet) supplemented or not with 0.2% (wt/wt) Lovastatin (Sequoia Research, CA, USA) for 10 days.

Lipoprotein purification and labeling

Human plasma (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) lipoproteins were isolated by sequential ultracentrifugation using a LKB ultracentrifuge (RP55T rotor at 40 000 rpm for 20 h at 4°C) by adjusting densities to obtain individual lipoproteins (1,019, 1,063 and 1,21 g/mL for VLDL/IDL, LDL, HDL, respectively) with NaCl/NaBr solutions. Then, lipoprotein fractions were dialysed against dialysed 3 times against a NaCl 0.15 M, KH₂PO₄ 20 mM, EDTA 1 mM buffer for 12 h at 4°C. Fast protein liquid chromatography analysis was performed at room temperature to validate the purity of each lipoprotein fraction. As indicated, lipoproteins were either incubated overnight at 4°C with free ^3H -cholesterol and LPDS (LipoProtein Depleted Serum) or overnight at 37°C with ^3H -cholesteryl oleate and LPDS.

Radiolabelling procedure with ^{125}I was performed according to the iodogen method modified by Fraker et al.¹. One mg LDL was labelled with 0,2mCi ^{125}I using 100mg iodogen for 30 min.

Unbound ^3H -cholesterol, ^3H -cholesteryl oleate, ^{125}I were removed using exclusion diffusion column (Sephadex G25 - GE Healthcare, Fairfield, USA).

Mouse intestinal perfusion

Male mice were anesthetized with a ketamine/xylazine mix (90/10 mg/Kg BW IP) and placed onto a heat pad. Perfusion solution composition as well as surgical procedures to realize bile duct diversion and proximal intestinal cannulation was performed as described by Van der Velde et al.². The intestinal perfusion was initiated 15 minutes prior to injection of lipoproteins to verify that surgical procedures did not cause luminal bleeding. Bile was diverted and collected by gravimetry. Proximal small intestines (10 cm) were perfused using a stable flux of 5 ml/h. The perfusion solution consisted of a modified solution of KREBS (119,95 mmol/L NaCl, 4,8 mmol/L KCl, 1,2 mmol/L KH₂PO₄, 1,2 mmol/L MgSO₄ .7H₂O, 15 mmol/L sulfonic acid 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane, 1,3 mmol/L CaCl₂.2H₂O and 10 mmol/L L-glutamine ; pH 7,4) supplemented with taurocholate / phosphatidylcholine (10 mmol/L taurocholate : 2 mmol/L phosphatidylcholine) as cholesterol acceptors. ^3H -cholesterol, ^3H -cholesteryl oleate labeled

lipoproteins (6.10^6 and 1.10^6 CPM/mouse respectively) or endolipid containing ^3H -cholesterol (6.10^6 CPM/mouse) were injected via the penile vein. Blood samples were harvested at 0, 2, 30, 60 and 120 minutes after injection to determine plasma cholesterol and ^3H -cholesterol levels. Intestinal perfusates were collected every 15 minutes over 120 minutes. The results correspond to the average of radioactivity measured in these collections.

TICE measurement in Ussing chambers

Proximal intestinal explants from C57BL/6 mice and human jejunum were fixed on sliders (P2405 - physiologic instruments) and then placed in Ussing chambers (P2400 - physiologic instruments). Unless specified in the legend, intestinal explants were incubated at 37°C in presence of an oxygenated Krebs solution (NaCl 115 mM; NaHCO_3 25 mM; K_2HPO_4 2,4 mM; MgCl_2 1,2 mM; CaCl_2 1,2 mM; KH_2PO_4 0,4 mM) containing 10 mmol/L Glucose (basal chamber) or 10mM Mannitol apical chamber. The apical chamber also contains cholesterol acceptors (10 mM taurocholate, 2 mM phosphatidylcholine). ^3H -cholesterol labeled lipoproteins (4.10^6 CPM/ml) were added to the basal chamber. The integrity of the intestinal explants was determined by verifying the absence of leakage of non-permeable 70kDa FITC-dextran beads (Sigma-Aldrich, France) from the basal to the apical chamber. Medium in the apical chamber was collected and renewed every 30 min. Unless indicated, TICE represents the average of radioactivity over 3 periods of 30 min. Eventually intestinal explants were digested overnight at 37°C in an aqueous based solubilizer (Solvable - Perkin Elmer) in order to measure their radioactive content.

Subjects: Human intestinal biopsies were obtained from patients undergoing bariatric surgery (Roux-en-Y gastric by-pass), with their informed consent and according to the French laws (Nantes University Hospital ID RCB: 2006-A00196-45; Reference CPP: 2006/31; BRD: 06/8-1).

Plasma cholesterol measurement

Plasma total Cholesterol concentrations were determined using a commercially available kit (BioMerieux, France).

Western blots

Intestinal mucosae were scraped and homogenized in a RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic). Total lysate proteins were resolved on NuPAGE 4–12% BisTris gels in MES SDS buffer (Invitrogen) under reducing conditions and transferred using Iblot system onto a nitrocellulose membrane (Invitrogen). Membranes were probed with antibodies raised against the mouse LDLR antibody (R&D Systems Europe, Lille, France) and cyclophilin A (Millipore, France). Immunoreactive bands were revealed using the ECL plus kit (Amersham Biosciences).

Cytotoxicity assay: Cytotoxicity was routinely measured using LDH cytotoxicity assay kit in apical medium (Abcam, Paris, France).

^3H -Cholesterol measurement

Plasma (20 μl), intestinal perfusates (500 μl) and Ussing media (500 μl) were mixed with 5 ml of liquid scintillation (ECOLITE, Perkin Elmer) and radiolabeled cholesterol levels were assessed by liquid scintillation counting.

¹²⁵I-LDL clearance

C57BL6J or LDLR^{-/-} 12h-fasted anesthetized mice received an intravenous injection of ¹²⁵I-labelled LDL (10µg; 1252 CPM/ng). Blood was harvested at 2, 15 and 120 minutes after injection. After two hours, mice were exsanguinated by puncturing the right atrium. Heart were perfused with 10 ml of saline to clear plasma ¹²⁵I-labelled LDL associated with tissues. Thereafter, liver and small intestine were harvested. Small intestine was divided in 3 equal proximal, medial, distal segments. Lumen of each segment was gently flushed with saline solution. Plasma, liver and intestinal segment radioactivity were measured with a GammaCounter (1480 Wizard 300 Automatic Gamma Counter, Wallac, Waltham, Massachusetts, USA).

Fecal cholesterol excretion

Food consumption over 3 days was measured by weight difference method. Feces was collected every 24 h during the same period of time. Feces were desiccated overnight and ground. One hundred mg of feces were resuspended in 2 ml H₂O for 10 h at 4°C on a rotating wheel. Liquid extraction with chloroform/methanol was performed overnight at 4°C on a rotating wheel. Samples were centrifuged and the inferior phase containing the lipids was evaporated with N₂ and dissolved in 100 µL ethanol (repeated agitation with a vortex over 8 hours) and sonicated for 5 min. Cholesterol was measured in these extracts using a commercially available kit (BioMerieux, France).

Cholesterol absorption measurement-Plasma dual isotope ratio method

A feeding needle with round tip was inserted into the stomach of non-fasted mice, and each animal was given an intragastric bolus of 1 µCi [¹⁴C] cholesterol in olive oil. Under anaesthesia, 1 µCi [³H] cholesterol in Endolipid was injected via the penile vein. After dosing, mice were returned to cages, where they were free to feed for an additional 3 days. Animals were then anesthetized, and bled from the heart. Proportions of [¹⁴C] cholesterol and [³H] cholesterol doses remaining in plasma at 3 days were determined by liquid scintillation counting. The plasma ratio of the 2 radiolabels was used for calculating the percent cholesterol absorption as described elsewhere³.

Statistics

All results are reported as means ± SEM. Statistical significance was analyzed using a non-parametric Mann-Whitney test. The values of p < 0.05 were considered as significant.

Reference List

- (1) Fraker PJ, Speck JC, Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;80:849-857.

- (2) Van der Velde AE, Vriens CL, van den Oord C, Kunne C, Oude Elferink RP, Kuipers F, Groen AK. Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 2007;133:967-975.
- (3) Wang DQ, Paigen B, Carey MC. Genetic factors at the enterocyte level account for variations in intestinal cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. *J Lipid Res* 2001;42:1820-1830.

ARTICLE 2

Manuscrit en Préparation

L'EXCRETION TRANSINTESTINALE DE CHOLESTEROL EST INDUITE PAR LA DIOSGENINE CHEZ LES FEMELLES DEFICIENTES EN RECEPTEUR AU LDL

Diosgenin Induced TransIntestinal cholesterol excretion in LDL receptor deficient females

L'EXCRETION TRANSINTESTINALE DE CHOLESTEROL EST INDUITE PAR LA DIOSGENINE CHEZ LES FEMELLES DEFICIENTES EN RECEPTEUR AUX LDL

Diosgenin Induced TransIntestinal cholesterol excretion in LDL receptor deficient females

RESUME

L'excrétion transintestinale du cholestérol (TICE) permet la fuite du cholestérol plasmatique via les cellules intestinales, elle a été décrite comme la voie majoritaire d'élimination du cholestérol. A ce jour, les modulateurs et les déterminants moléculaires impliqués dans cette voie restent largement inconnus. La diosgénine est un stéroïde végétal qui possède des propriétés hypocholestérolémiantes. Chez le rongeur, un régime supplémenté en diosgénine induit une forte augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol attribuée à une stimulation de l'excrétion biliaire et à une inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol.

Le but de cette étude a été de déterminer si l'action hypocholestérolémiante de la diosgénine pouvait également être due à une stimulation du TICE et si oui, d'identifier son mode d'action moléculaire.

Des souris sauvages C57Bl/6 ou déficientes pour le récepteur au LDL ont été nourries pendant 10 jours avec un régime standard enrichi ou non de 1% de diosgénine (wt/wt). La diosgénine ne modifie ni la prise alimentaire ni le poids corporel des souris. Chez les souris sauvages, la diosgénine induit une hypocholestérolémie mais n'affecte pas significativement le TICE en dépit d'une tendance à l'augmentation. Chez les femelles LDLR KO, la diosgénine réduit la cholestérolémie et stimule significativement le TICE. La diosgénine est en revanche sans effet chez les males. Dans nos conditions expérimentales, nous avons constaté que la diosgénine induit une hépatomégalie en partie attribuable à une accumulation de triglycérides. L'analyse transcriptionnelle du foie et de l'intestin chez des souris sauvages montre que la diosgénine augmente l'expression de plusieurs gènes cibles du récepteur nucléaire PXR. Toutefois, la stimulation de l'excrétion fécale de cholestérol par la diosgénine est comparable entre femelles sauvages et PXR KO. Les mécanismes moléculaires induits par la diosgénine restent donc à être déterminés.

En conclusion, nos données montrent pour la première fois que le TICE est induit par la diosgénine chez des femelles hypercholestérolémiques. Notre objectif est à présent de définir son mode d'action et de mieux comprendre les déterminants moléculaires impliqués dans la régulation du TICE.

Mots clés : TICE, diosgénine, cholestérolémie, excrétion biliaire du cholestérol, absorption intestinale du cholestérol, dimorphisme sexuel.

ABREVIATIONS

³H, tritium ; ¹⁴C, carbone 14 ; ABCA1, ATP-binding cassette, sous famille A, isoforme 1 ; ABCB1, ATP-binding cassette, sous famille B, isoforme 1 ; ABCB4, ATP-binding cassette, sous famille B, isoforme 4 ; ABCG5/8, ATP-binding cassette, sous famille G, isoforme 5/8 ; ADN, Acide désoxyribonucléique ; ARN, Acid ribonucléique ; CAR, Constitutive Androstane Receptor ; CD36, Cluster of Differentiation 36 ; Ci, Curie ; CPM, Coups par minute ; Cyp3A11, cytochrome P450 3A11 ; Cyp7A1, cytochrome P450 7A1 ; Cyp2b10, cytochrome P450 2B10 ; DIOS, Diosgénine ; dNTP, Deoxynucleotide ; DTT, dithiothreitol ; EDTA, Acide éthylène diamine tétracétique ; ER, Récepteur aux estrogènes ; FAS, fatty acid synthase ; FPLC, Fast protein liquid chromatography ; HDL, High density lipoprotein ; HMG-CoA réductase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A réductase ; KO, Knock-out ; LDL, Low density lipoprotein ; LDLR, Récepteur aux LDL ; LXR, Liver X receptor ; MML-V RT, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; NPC1L1, Niemann-Pick C1 Like1 ; PBS, Tampon phosphate salin ; qPCR, quantitative polymerase chain reaction ; PCR, polymerase chain reaction ; PCSK9, Protéine convertase subtilisine/kexine de type 9 ; PPAR δ , Peroxisome proliferator-activated receptor delta ; PXR, Pregnane X receptor ; RNase, Ribonucléase ; RPM, Rotation par minute ; SCD-1, Stearoyl-CoA desaturase-1 ; SHP, small heterodimer partner ; SREBP1c, Sterol-responsive element-binding protein 1c ; SREBP2, Sterol-responsive element-binding protein 2 ; STD, standard ; TC/PC, Taurocholate / phosphatidylcholine ; TICE, Transintestinal cholesterol excetion ; VLDL, Very low density lipoprotein ; WT, Wild type.

INTRODUCTION

L'homéostasie du cholestérol au sein de l'organisme est déterminée par une balance entre l'apport, la synthèse, l'utilisation et l'élimination du cholestérol. Le foie est capable de synthétiser et de prendre en charge le cholestérol alimentaire pour l'emballer au sein des lipoprotéines et de le distribuer aux tissus périphériques. Il va également être capable de recevoir le cholestérol des lipoprotéines et de l'excréter dans la bile. Le foie n'est pourtant pas le seul organe à avoir un rôle majeur dans le métabolisme du cholestérol, l'intestin a aussi une place capitale dans le maintien de son homéostasie. En 2007, Van der Velde *et al.* ont mis en évidence qu'en plus de la fonction importante de l'intestin dans l'absorption du cholestérol, cet organe est capable d'excréter du cholestérol pour son élimination fécale. L'excrétion transintestinale du cholestérol (TICE) permet l'élimination du cholestérol plasmatique par une voie complémentaire de la voie hépatobiliaire [1]. Malgré son importance, cette voie est relativement peu caractérisée. Chez la souris, le TICE est maximal au niveau de la partie proximale de l'intestin [1] et il représente 33% de l'excrétion fécale de cholestérol à l'état basal [2]. La présence d'accepteurs de cholestérol dans la lumière intestinale, un mélange d'acides biliaires et de phospholipides stimule le TICE. Au niveau moléculaire, au sein de la membrane basolatérale des entérocytes, nous avons précédemment montré que le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR) est impliqué mais non limitant dans le TICE à partir du LDL-cholestérol plasmatique [3]. Au sein de la membrane apicale des entérocytes, l'hétérodimère ATP binding cassette G5 et G8 (ABCG5/G8) [2] et le transporteur ABCB1 [3] semblent impliqués dans l'efflux du cholestérol pour le TICE. Différentes études ont montré l'inductibilité du TICE par l'activation des récepteurs nucléaires LXR (Liver X Receptor) et PPAR δ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor delta) [4][2], par des régimes alimentaires [5][6] ou encore par différents composés pharmacologiques [7][3]. Malgré ces résultats importants, les études actuelles ne permettent pas d'établir un mécanisme moléculaire clair pour le TICE et sa régulation. La compréhension des mécanismes mis en jeu dans cette nouvelle voie d'épuration du cholestérol plasmatique est pourtant cruciale et pourrait à terme offrir une alternative thérapeutique pour lutter contre l'hypercholestérolémie.

La diosgénine est un stéroïde végétal présent dans plusieurs espèces végétales dont l'igname et classiquement utilisé en médecine traditionnelle asiatique. Cette molécule est connue pour ces propriétés hypocholestérolémiantes, démontrées chez le rat [8] et chez la souris [9]. La diosgénine stimule l'excrétion fécale de cholestérol cependant, cet effet ne passe pas uniquement par l'inhibition de NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) [10], protéine limitante responsable de l'absorption intestinale du cholestérol [11]. L'hétérodimère ABCG5/G8 est indispensable pour l'excrétion hépatobiliaire du cholestérol [12][13]. Il est aussi nécessaire pour l'induction de l'efflux du cholestérol dans la bile suite à un traitement avec la diosgénine même si la diosgénine n'a pas d'effet sur l'expression d'ABCG5/G8 au niveau hépatique [14]. L'effet hypocholestérolémiant de la diosgénine ainsi que les mécanismes responsables de l'augmentation de l'excrétion fécale des stérols neutres sans modification de l'élimination des acides biliaires sous diosgénine [8, p. 197][10] reste à ce jour largement incompris. L'implication de la diosgénine dans le TICE reste à déterminer.

Afin de caractériser l'effet de la diosgénine sur l'absorption et la contribution relative des voies biliaire et intestinale d'excrétion du cholestérol chez des souris mâles et femelles normo- et hypercholestérolémiques, des souris C57Bl/6 sauvages ou déficientes pour le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR) ont été nourries pendant 10 jours avec un régime supplémenté ou non en diosgénine 1% (wt/wt). Par une technique précédemment décrite de mesure du TICE *in vivo* [3], nous montrons que la modulation pharmacologique du TICE par la diosgénine induit une modulation du TICE dépendante du sexe et de l'état physiopathologique normo- ou hypercholestérolémique de la souris.

MATERIELS ET METHODES

Animaux et régime

Les souris sauvages C57BL/6 (Charles River, l'Arbresle, France) et les souris déficientes pour le LDLR (Jackson laboratories, Maine, USA) ont été hébergées dans des cages plastiques sous température (21,5°C) et hygrométrie régulées, avec un cycle nyctéméral de 12h de jour / 12h de nuit dans une animalerie dépourvue de pathogènes. Les souris ont été nourries *ad libitum* avec un régime standard (Safe, régime A03, 0,015% de cholestérol) avant une supplémentation en diosgénine et ont un accès libre à l'eau de boisson. A l'âge de 8 semaines, les souris sauvages C57BL/6 ou déficientes en LDLR ont reçu un régime supplémenté avec 1% (wt/wt) de diosgénine. La diosgénine (42499, pure à 99%, Sigma-Aldrich, France) a été incorporée au régime standard par la société SAFE. Les conditions d'hébergement ainsi que l'ensemble des expérimentations réalisées sur les souris ont été validées par le comité d'éthique en expérimentation animale des Pays de la Loire.

Mesure de la prise alimentaire, de l'excrétion fécale de cholestérol et de l'absorption intestinale du cholestérol

Les souris sont hébergées dans des cages individuelles pendant 10 jours et reçoivent un régime standard ou supplémenté avec 1% de diosgénine (wt/wt). Au cours des trois derniers jours de régime, l'intégralité des fèces produites en 24h est récupérée et la nourriture est pesée afin de déterminer la prise alimentaire quotidienne. Le dernier jour, les souris sont anesthésiées, pesées et euthanasiées par exsanguination. Les fèces sont lyophilisées puis stockées à -80°C. Une extraction lipidique des fèces est réalisée par saponification. Brièvement, les fèces sont pesées puis broyées. Deux millilitres d'eau distillée sont ajoutés à cent milligrammes de fèces. Deux millilitres d'éthanol absolu sont ajoutés au mélange puis 400 µl de NaOH 10N. Le mélange est ensuite chauffé à 95 °C pendant 2 heures, durant lesquelles il est vortexé toutes les 15 min. La solution est ensuite laissée à température ambiante pendant 30 min puis 3 ml d'eau distillée et 6 ml d'hexane sont ajoutés avant de mélanger la solution. La phase supérieure, correspondant à la phase hydrophobe, est récupérée puis déposée dans un nouveau tube. Une seconde extraction est réalisée selon la même procédure que l'étape précédente. Le pool des deux solutions récupérées est séché sous azote à 50 °C puis resuspendu dans 500 µl d'isopropanol. Un dosage de cholestérol est enfin effectué sur les échantillons (Cholestérol RTU ref. : 61 218/61 219, Biomérieux, France).

Mesure de l'absorption intestinale de cholestérol

Après 10 jours de régime standard ou supplémenté en diosgénine 1%, les souris reçoivent une injection intraveineuse d'un microcurie (µCi) de ³H-cholestérol dilué dans une solution micellaire commerciale (Intralipid 20%, Fresenius, France) puis un gavage d'un µCi de ¹⁴C-cholestérol dilué dans 200 µl d'huile d'olive. Trois jours après l'administration des traceurs, les souris sont anesthésiées puis euthanasiées par exsanguination. Le plasma est obtenu en centrifugeant les prélèvements sanguins à 6000 RPM pendant 5 minutes à 4°C. Les

quantités de ^{14}C -cholestérol et de ^3H -cholestérol sont déterminées à l'aide d'un compteur de radioactivité à scintillation liquide (Hidex 300SL, Sciencetec, France) après avoir ajouté 5 ml de scintillant (ECOLITE, Perkin Elmer, France).

Le pourcentage de cholestérol absorbé est calculé selon la formule : % absorption du cholestérol = (% de la dose intragastrique de ^{14}C -cholestérol / % de la dose intraveineuse de ^3H -cholestérol) x 100.

Dosage plasmatique et hépatique des triglycérides et du cholestérol

Avant et 10 jours après la mise sous régime, 50 μl de sang sont prélevés à la veine de l'extrémité de la queue de chaque souris et collectés dans un tube EDTA. Le sang est centrifugé 5 minutes à 6 000 RPM à 4°C pour ne récupérer que le plasma. Les dosages du cholestérol (Cholestérol RTU ref. : 61 218/61 219, Biomérieux, France) et des triglycérides (TG PAP 150 ref. : 61 236, Biomérieux, France) plasmatiques sont réalisés à l'aide de kits commerciaux.

L'analyse du contenu hépatique en triglycérides et en cholestérol est réalisé de la manière suivante : après pesée et euthanasie de l'animal, le foie est récupéré, pesé et rapidement congelé dans de l'azote liquide puis stocké à -80°C. L'extraction lipidique est réalisée à partir d'un fragment d'environ 100 mg du grand lobe hépatique. Après broyage (polytron® PT2500E, Kinematica AG) dans 2 ml d'eau distillée, 400 μl de NaOH 10N et 2 ml d'éthanol absolu sont ajoutés à l'homogénat. Le mélange est ensuite chauffé à 95 C° pendant 2 heures, durant lequel il est homogénéisé toutes les 15 min. La solution est ensuite laissée à température ambiante pendant 30 min puis 3 ml d'eau distillée et 6 ml d'hexane sont ajoutés avant de mélanger la solution. La phase supérieure, correspondant à la phase hydrophobe, est récupérée puis déposée dans un nouveau tube. Une seconde extraction est réalisée selon la même procédure que l'étape précédente. Le pool des deux solutions récupérées est séché sous azote à 50 C° puis resuspendu dans 500 μl d'isopropanol. Un dosage de cholestérol est effectué sur les échantillons (Cholestérol RTU ref. : 61 218/61 219, Biomérieux, France).

Analyse du profil lipoprotéique par chromatographie en phase liquide (FPLC)

A l'aide d'un système de FPLC (ÅKTA FPLC, GE Healthcare, USA) équipé de deux colonnes d'exclusion (superose 6, GE Healthcare, USA), les différentes classes de lipoprotéines des pools d'échantillons plasmatiques sont séparées selon leur taille. L'analyse est effectuée à partir d'un échantillon de pool plasmatique de 250 μl et l'élution est ensuite réalisée avec un tampon FPLC (1 mM d'EDTA, 0,9% NaCl, 0,02% NaN_3 , pH=8,2). La quantité de cholestérol et de triglycérides associée aux fractions est dosée à l'aide de kits commerciaux (Cholestérol RTU, TG PAP 150, Biomérieux, France).

Séparation et radiomarquage des LDL humaines

Les lipoprotéines de plasma humain (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) sont isolées par ultracentrifugations séquentielles via une ultracentrifugeuse (Rotor RP55T, 40 000 RPM, 20 heures à 4°C) par ajustement des densités avec des solutions de NaCl/NaBr (respectivement 1,019, 1,063 et 1,21 g/ml pour les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines

de faible densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL)). Les fractions lipoprotéiques obtenues sont ensuite dialysées 3 fois contre un tampon de NaCl 0,15 M, KH₂PO₄ 20 mM, EDTA 1 mM pendant 12 heures à 4°C. Une analyse par FPLC est alors réalisée à température ambiante pour valider la pureté de chaque fraction lipoprotéique isolée.

Le marquage de la fraction de LDL s'effectue selon la procédure suivante : le cholestérol tritié (Perkin Elmer, France) est additionné à un mélange de HDL et LPDS (sérum délipidé), obtenu par ultracentrifugation, puis incubés à 37 °C sur la nuit, sous agitation. Les LDL sont ajoutées au mélange puis après avoir été incubées à 37 °C sous agitation durant 6 heures, la solution est dialysée pendant 12 heures dans un tampon de dialyse (NaCl 87,66 g/l ; EDTA 7,49 g/l ; KH₂PO₄ 27,21 g/l ; pH = 7,2) à 4°C, sous agitation. Afin de récupérer les LDL, la densité de la solution est ajustée avec des sels de NaBr (1,063 pour les LDL). Les LDL sont alors isolées par ultracentrifugation via une ultracentrifugeuse (TL100, à 110 000 RPM, 6 heures à 10°C). Les LDL récupérées sont condensées (Amicon® Ultra-4, Millipore, USA) par centrifugations successives (Sigma, 4 000 RPM, 3 x 10 minutes à 4°C). Les LDL sont ensuite passées sur des colonnes d'extrusion / diffusion (Sephadex™ G-25 PD10, GE healthcare, USA) pour éliminer le cholestérol tritié non incorporé dans les LDL. Afin d'éliminer le NaCl restant, les LDL peuvent être recondensées. Dix microlitres de LDL sont ajoutés à 5 ml de scintillant (ECOLITE, Perkin Elmer, France) afin d'évaluer la radioactivité de l'échantillon source de ³H-cholestérol LDL. Des dosages de l'Apo B et de l'Apo AI sont réalisés à l'aide de kits commerciaux (Apolipoprotein A1 and B tests LP 3023, Randox Laboratories Ltd., UK) sur l'échantillon source de ³H-cholestérol LDL obtenu afin de confirmer la seule présence de l'Apo B marqueuse de LDL.

Mesure du TICE *in vivo* : perfusion intestinale chez la souris

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange Ketamine / Xylazine (90/10 mg/kg de poids corporel) puis disposées en décubitus dorsal sur un tapis chauffant. La procédure chirurgicale permettant la dérivation biliaire et la canulation de l'intestin proximal est réalisée selon la procédure précédemment décrite par Van der Velde *et al.* [1]. La perfusion intestinale est initiée 15 minutes avant l'injection de ³H-cholestérol LDL afin de vérifier que l'intervention chirurgicale n'a pas causé de saignements qui pourraient contaminer les perfusats intestinaux. La bile est dérivée et collectée par gravimétrie. L'intestin proximal (10 premiers centimètres sous l'arrivée du canal cholédoque) est perfusé à un flux stable de 5 ml/heure. La solution de perfusion est composée d'une solution de Krebs (119,95 mmol/L NaCl, 4,8 mmol/L KCl, 1,2 mmol/L KH₂PO₄, 1,2 mmol/L MgSO₄ . 7H₂O, 15 mmol/L acide sulfonique 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane, 1,3 mmol/L CaCl₂ . 2H₂O et 10 mmol/L L-glutamine ; pH final à 7,4) supplémentée avec un mélange de taurocholate / phosphatidylcholine (10 mmol/L L-glutamine : 2 mmol/L phosphatidylcholine) comme accepteur de cholestérol. Le ³H-cholestérol LDL (6.10⁶ CPM/ souris) est injecté via la veine péniennne. Des échantillons sanguins sont collectés à 0, 2, 30, 60 et 120 minutes après l'injection afin de déterminer la cholestérolémie et les niveaux de ³H-cholestérol plasmatiques. Les perfusats intestinaux sont collectés toutes les 15 minutes sur 120 minutes. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de la radioactivité mesurée dans les perfusats intestinaux.

Mesure du ³H-cholestérol

Le plasma (20 µL) et les perfusats intestinaux (500 µL) sont mélangés à 5 mL de liquide de scintillation (ECOLITE, Perkin Elmer, France) et la radioactivité associée est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Hidex 300SL, Sciencetec, France).

Extraction d'ARN et analyse de l'expression génique

Les ARN totaux ont été isolés à partir d'échantillons de foie et de muqueuse de l'intestin proximal à l'aide du kit Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Les ARN totaux sont dosés puis retro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc). 500 ng d'ARN sont ajoutés à 375 ng d'amorces aléatoires puis de l'eau sans RNase est ajoutée afin d'atteindre un volume de 15 µL. Le mélange est chauffé à 68°C pendant 5 minutes puis directement placé dans de la glace. Un mélange de retro-transcription est préparé en ajoutant 2 µL d'une solution de quatre desoxyribonucléotides 10mM (dNTPs) à 3 µL de dithiothréitol 0,1 M (DTT), 2 µL d'eau RNase free, 1 µL d'un inhibiteur de ribonucléase (RNase out), 1 µL de reverse transcriptase virale d'origine murine (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase MML-V RT) et à 6 µL de tampon 5X. Quinze microlitres du mélange de rétro-transcription sont ajoutés aux solutions d'ARN et incubés à 42°C pendant 1 heure. Les ADNc obtenus sont dilués au 1/12 avec de l'eau stérile. Des aliquotes de 2,5 µl l'ADNc sont déposés en triplicatas sur une plaque 96 puits dédiée. Une solution de Q-PCR est préparée à partir de 500 µL de sybergreen (MESA GREEN qPCR MasterMix Plus ref :RT-SY2X-03+WOU, Eurogentec), 275 µL d'eau stérile, 50 µL d'amorces sens et 50 µL d'amorces antisens (Eurogentec). Un aliquote de 17,5 µl de cette solution est ajouté à l'ADNc. La mesure de la fluorescence émise par le sybergreen, proportionnelle aux nombres d'amplicons, est effectuée à l'aide d'un thermocycleur (steponePlus™, Applied Biosystem). La cyclophiline est utilisée comme gène de référence pour ces études.

Statistiques

Les données sont présentées sous la forme de la moyenne plus ou moins l'écart standard à la moyenne (S.E.M). La significativité statistique est analysée par un test non paramétrique de Mann-Whitney. Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme significatives.

RESULTATS

La diosgénine n'affecte ni la prise alimentaire ni le poids corporel des souris sauvages

La prise alimentaire des animaux a été déterminée en mesurant quotidiennement la nourriture consommée sur les 3 derniers jours de régime. La prise alimentaire des souris sauvages soumises à un régime supplémenté de diosgénine 1 % (wt/wt) est inchangée par rapport à des souris sous régime standard. Le poids moyen des souris du groupe standard par rapport à celui des souris sous diosgénine 1%, chez des souris sauvages C57Bl/6 mâles ou femelles n'est pas significativement différent. Un régime de 10 jours contenant 1% de diosgénine n'influe donc pas sur le poids de l'animal (**Tableau 1**).

C57Bl/6 sauvages	Mâles		Femelles	
	STD	DIOS	STD	DIOS
Prise alimentaire (g/jour)	3,67 ± 0,09	3,60 ± 0,14	3,76 ± 0,06	3,64 ± 0,08
Poids corporel (g)	21,30 ± 0,34	22,20 ± 0,43	18,70 ± 0,23	18,60 ± 0,27

Tableau 1. Effet de la diosgénine sur la prise alimentaire et le poids des souris C57Bl/6 sauvages.

Les résultats sont représentés sous forme de moyennes ± S.E.M., n = 8 dans chaque groupe.

La diosgénine réduit la cholestérolémie et stimule l'excrétion fécale de cholestérol chez des souris sauvages

On n'observe pas de différence de cholestérolémie chez des animaux sous régime standard entre le point initial et après 10 jours de régime. En revanche, la diosgénine réduit significativement la cholestérolémie (**Figure 1A**) de 19% chez les mâles et de 30% chez les souris femelles. L'effet hypocholestérolémiant de la diosgénine est associé à une augmentation de l'excrétion fécale du cholestérol (**Figure 1B**). Des souris femelles sauvages C57Bl/6 placées en cages individuelles pendant 3 jours et soumises à un régime supplémenté en diosgénine présentent une quantité moyenne de cholestérol dans leur fèces plus importante (+ 130%) que des animaux sous un régime standard. Nos observations sont en accord avec des résultats précédemment publiés [10]. Cette différence est retrouvée chez les mâles (+ 125% par rapport aux contrôles). Par ailleurs, la diosgénine n'a pas induit de modification de la production des fèces chez les animaux.

La diosgénine réduit l'absorption intestinale du cholestérol chez les femelles sauvages

La diosgénine ne parvient pas à stimuler le TICE (**Figure 1C**) chez les souris sauvages C57Bl/6. Néanmoins, les animaux mâles ou femelles recevant un régime supplémenté en diosgénine présentent une tendance à l'augmentation de l'excrétion transintestinale du cholestérol par rapport à des animaux sous régime standard (+ 35% $p=0,11$ pour les mâles et + 35% $p=0,35$ pour les femelles). De plus, la diosgénine stimule l'expression de gènes impliqués dans le TICE au niveau de l'intestin. Chez des souris femelles sauvages C57Bl/6, l'expression génique du LDLR, qui permet le captage des LDL plasmatiques et qui est impliqué dans le TICE [3], est fortement accrue au niveau de la muqueuse intestinale (+93%) sous un régime supplémenté en diosgénine par

comparaison au régime standard (**Figure 1D**). Le gène ABCB1a, impliqué dans l'export du cholestérol pour le TICE au niveau de la membrane apicale des entérocytes [3], est significativement augmenté de 71% sous diosgénine (**Figure 1D**). L'expression d'ABCG5/G8, qui joue un rôle dans le TICE en assurant 40% [2] de l'export apical du cholestérol, n'est pas modifiée dans l'intestin (**Figure 1G**).

L'excrétion biliaire suit les mêmes tendances que le TICE (**Figure 1E**) même si la diosgénine ne parvient pas à stimuler significativement l'excrétion biliaire chez les souris sauvages C57Bl/6.

La diosgénine diminue l'absorption intestinale de cholestérol chez des souris femelles sauvages C57Bl/6, indépendamment de l'expression des principaux gènes connus de l'absorption entérocytaire du cholestérol. En effet, nous montrons via une technique de double marquage que l'absorption intestinale du cholestérol est réduite chez des souris femelles sauvages C57Bl/6 soumises à un régime supplémenté en diosgénine par rapport à des souris sous un régime standard. Le pourcentage moyen d'absorption intestinale de cholestérol passe de $40,8 \pm 8,9$ % sous un régime standard à $18,3 \pm 6,0$ % sous diosgénine chez les femelles sauvages C57Bl/6 (**Figure 1F**). Nous n'avons pas observé de différence sur la prise alimentaire entre les animaux sous diosgénine et les animaux sous régime standard. Chez les souris femelles sauvages, l'expression génique des deux transporteurs clés de l'absorption intestinale du cholestérol, *i.e.* NPC1L1 et l'hétérodimère ABCG5/G8, n'est pas modifiée par la diosgénine (**Figure 1G**).

Chez les souris sauvages mâles, la diosgénine n'induit pas de modification de l'absorption intestinale du cholestérol (**Figure 1F**). Il a toutefois été précédemment reporté une baisse de l'absorption du cholestérol en fonction de la quantité de diosgénine présente dans la nourriture chez des rats mâles [8].

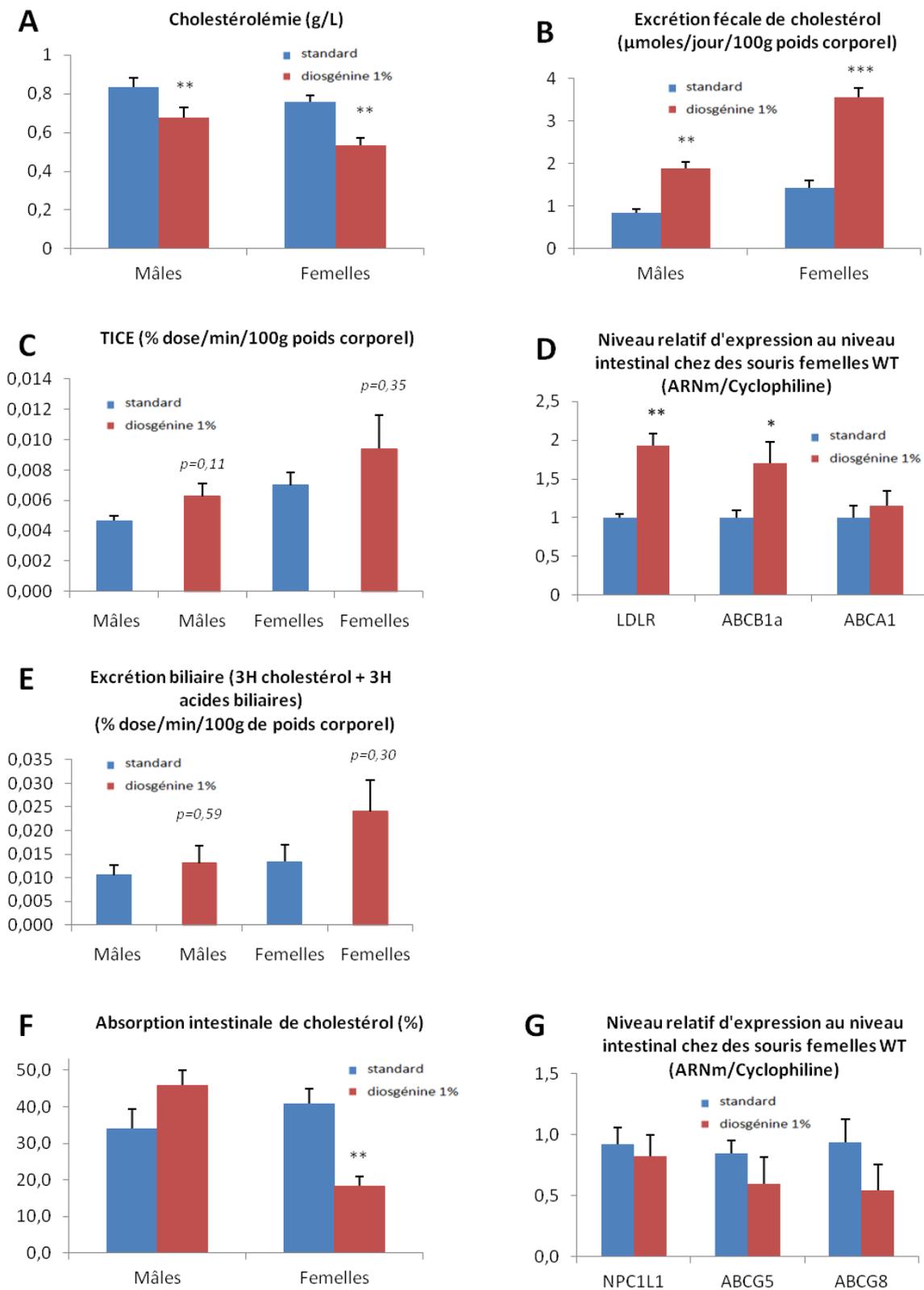


Figure 1 : Effet de la diosgénine sur (A) la cholestérolémie, (B) l'excrétion fécale de cholestérol, (C) l'excrétion transintestinale de cholestérol, (D) l'expression relative des gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines dont le TICE, (E) l'excrétion biliaire de cholestérol tritié et d'acides biliaires tritiés, (F) l'absorption intestinale de cholestérol, (G) l'expression relative des gènes impliqués dans l'absorption intestinale de cholestérol chez des souris C57Bl/6 sauvages. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes \pm S.E.M., n = 8 (A, C, E) et 5 (B, D, F, G) dans chaque groupe.

La diosgénine affecte la cholestérolémie chez les souris femelles déficientes pour le LDLR en réduisant spécifiquement les concentrations circulantes de LDL cholestérol

Chez les souris femelles LDLR KO, la diosgénine réduit significativement la cholestérolémie de 20% (**Figure 2A**). L'analyse quantitative par FPLC des lipoprotéines plasmatiques met en évidence que la diosgénine diminue spécifiquement les concentrations plasmatiques en LDL cholestérol par rapport aux contrôles (**Figure 2B**). Chez les mâles LDLR KO, la diosgénine n'a pas d'effet hypocholestérolémiant (**Figure 2C**). L'analyse du profil lipoprotéique par FPLC chez ces animaux montre que la diosgénine induit une réduction du LDL cholestérol plasmatique mais également une augmentation de la concentration en VLDL cholestérol (**Figure 2D**).

La diosgénine stimule le TICE et l'excrétion biliaire chez des souris femelles LDLR KO

Comme observé chez des souris normocholestérolémiques, les femelles hypercholestérolémiques déficientes pour le LDLR sous régime supplémenté en diosgénine présentent une quantité moyenne de cholestérol dans leurs fèces augmentée de 2,7 fois par rapport à des animaux soumis à un régime standard (**Figure 3A**).

Chez ces souris, une part des effets hypocholestérolémiants de la diosgénine peut être expliquée par la stimulation du TICE et de l'excrétion biliaire. La diosgénine induit significativement le TICE de 52,7 % (**Figure 3B**) et l'excrétion biliaire de cholestérol et d'acides biliaires tritiés de 2,6 fois (**Figure 3C**) chez les femelles déficientes en LDLR par rapport à des souris sous régime standard.

La diosgénine diminue l'absorption intestinale de cholestérol chez des souris femelles déficientes en LDLR (**Figure 3D**). Le pourcentage moyen d'absorption intestinale du cholestérol passe de $42,2 \pm 9,4$ % sous un régime standard à $26,3 \pm 3,9$ % sous diosgénine.

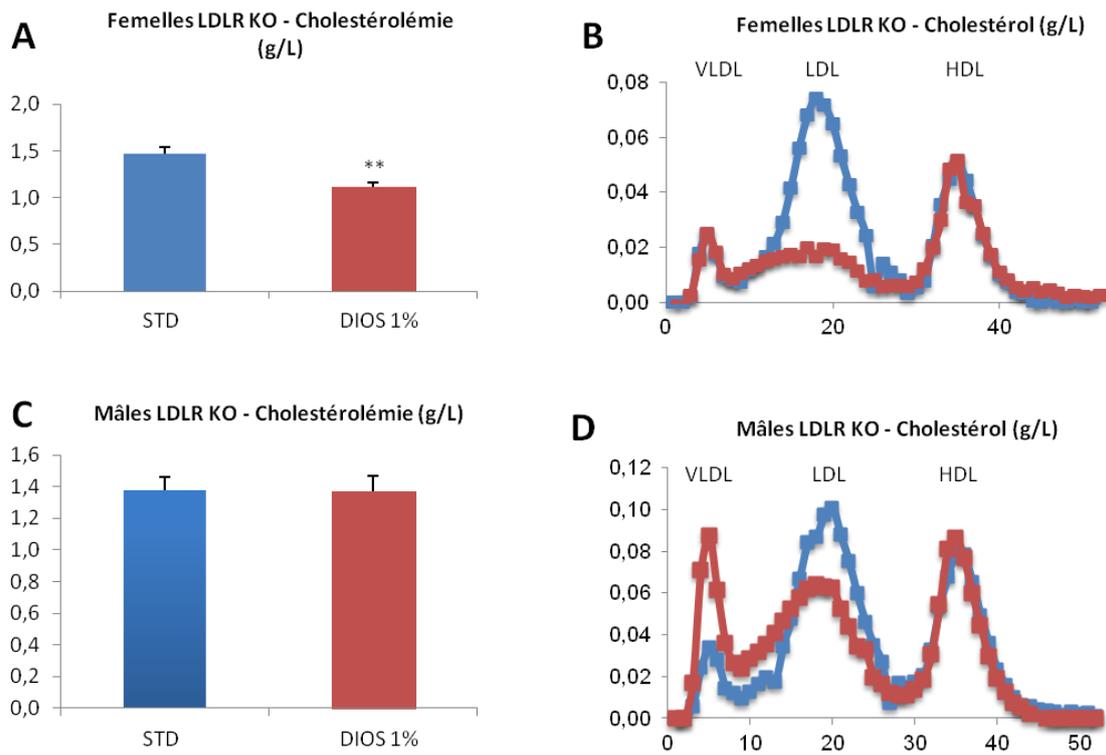


Figure 2 : Effet de la diosgénine sur (A, C) la cholestérolémie et (B, D) le profil FPLC lipoprotéique chez des souris déficientes pour le LDLR (LDLR KO). Les résultats sont représentés sous forme de moyennes \pm S.E.M., n = 8

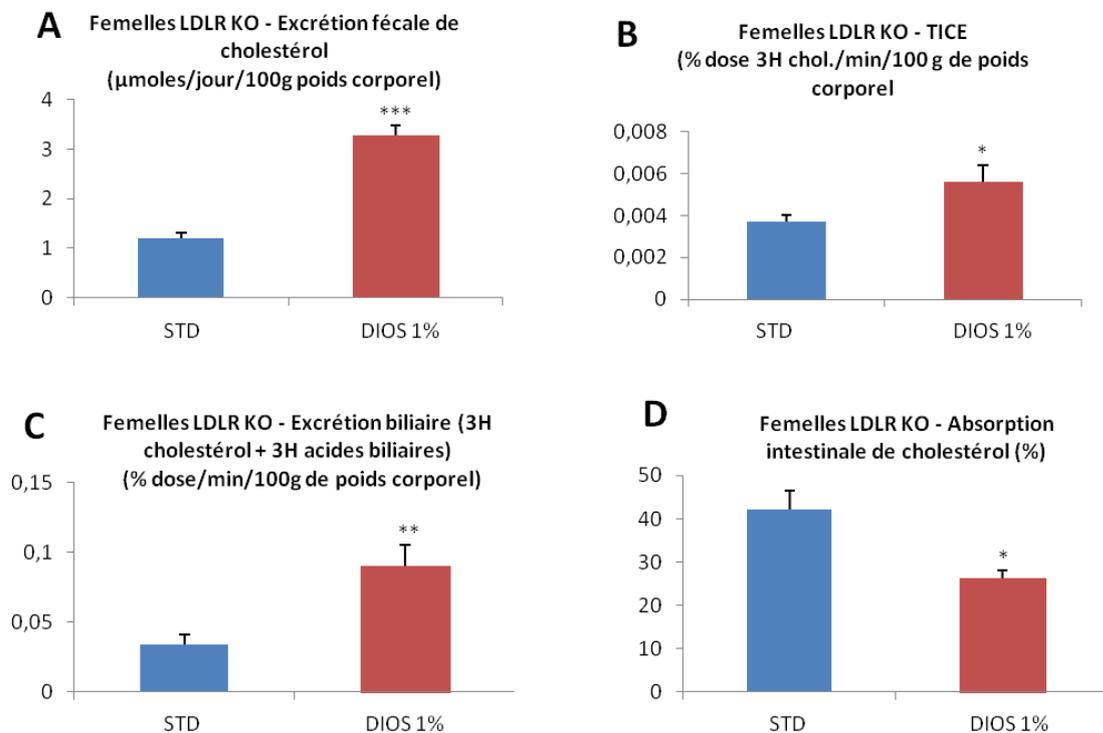


Figure 3 : Effet de la diosgénine sur (A) l'excrétion fécale de cholestérol, (B) l'excrétion transintestinale de cholestérol, (C) l'excrétion biliaire de cholestérol tritié et d'acides biliaries tritiés et (D) l'absorption intestinale de cholestérol chez des souris femelles déficientes pour le LDLR (LDLR KO). Les résultats sont représentés sous forme de moyennes \pm S.E.M., n = 8.

La diosgénine provoque une hépatomégalie et une stéatose hépatique

Les souris femelles sauvages C57Bl/6 présentent une forte augmentation du poids du foie sous diosgénine après 10 jours de régime par rapport à des souris sous régime standard (**Figure 4A**). Cet accroissement est en partie dû à une accumulation du cholestérol et des triglycérides au niveau hépatique. Le contenu hépatique en cholestérol et en triglycérides tend à être augmenté de + 44% ($p=0,15$) (**Figure 4B**) et de + 87% ($p=0,07$) (**Figure 4C**) respectivement.

Afin de caractériser l'accumulation lipidique au niveau hépatique des animaux sous diosgénine, nous avons évalué l'expression de gènes impliqués dans l'hépatomégalie. L'analyse de l'expression génique montre une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans la stéatose hépatique suite à un régime supplémenté en diosgénine chez les femelles sauvages C57Bl/6 (**Figure 4D**). L'expression des gènes codant LXR et SREBP1c (Sterol-Responsive Element-binding protein 1c) n'est pas induite sous diosgénine cependant, l'expression de deux des gènes cibles de SREBP1c est augmentée : le gène responsable de la synthèse des acides gras, la FAS (Fatty Acid Synthase) (+106%) et le transporteur d'acides gras CD36 (Cluster of Differentiation 36) (+87%).

La cycline D qui est impliquée dans le cycle cellulaire, est augmentée de 188%. Elle peut être un marqueur de la prolifération des cellules hépatiques (**Figure 4D**).

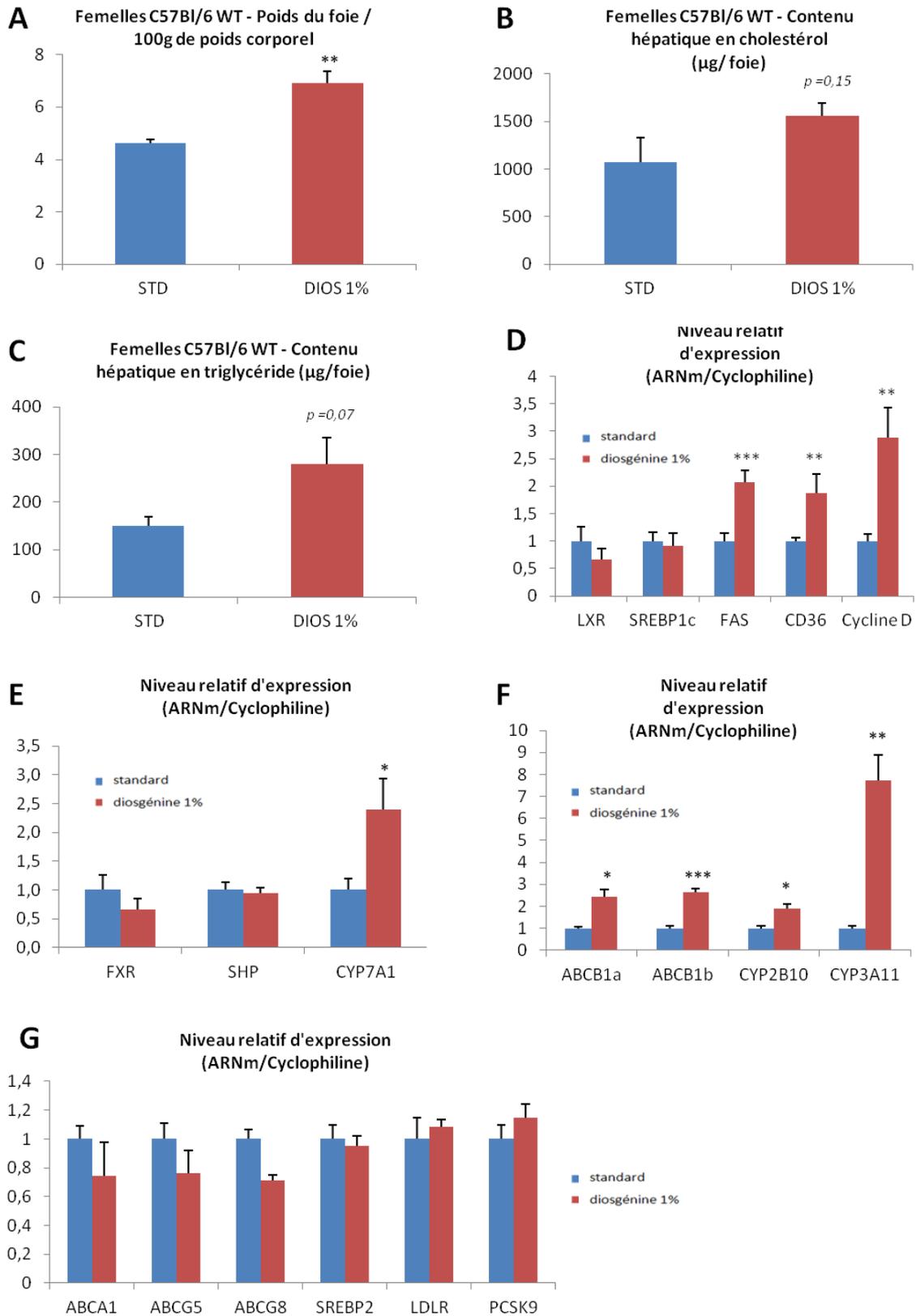


Figure 4 : Conséquence de 10 jours de régime diosgénine 1% sur (A) le poids du foie, (B) le contenu hépatique en cholestérol et (C) en triglycéride, (D) sur l'expression relative de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme des acides biliaires, (E) les gènes impliqués dans l'hépatomégalie, (F) les gènes cibles de PXR et (G) le métabolisme du cholestérol au niveau du foie chez des souris femelles sauvages C57Bl/6. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes \pm S.E.M., n = 6 dans chaque groupe.

La diosgénine module l'expression hépatique de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires chez des souris femelles sauvages C57Bl/6

Nous avons évalué l'effet de la diosgénine sur l'expression hépatique de gènes cibles de FXR (Farnesoïd X Receptor) (**Figure 4E**) et de LXR (**Figure 4G**). Ces récepteurs nucléaires jouent en effet un rôle central dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires. L'expression des gènes cibles de FXR, la CYP7A1 (Cytochrome P450 7A1), enzyme limitante de la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol, est significativement induite en réponse à la diosgénine chez les souris sauvages. Cependant, ceci ne semble pas dû à une modification de l'expression du récepteur nucléaire FXR ou de son inhibiteur physiologique, SHP (Small Heterodimer partner) dont les expressions sont inchangées. Sur l'expression des gènes cibles de LXR, la diosgénine ne modifie pas l'expression hépatique de l'hétérodimère ABCG5/G8 ni d'ABCA1 chez des souris femelles sauvages C57Bl/6. L'expression de SREBP2 (Sterol-Responsive Element-binding protein 2), gène clé de la régulation du cholestérol, du LDLR et de son inhibiteur physiologique PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), n'est pas modifiée sous un régime supplémenté en diosgénine. Enfin, la diosgénine stimule l'expression d'ABCB1 (**Figure 4F**) qui est impliqué dans la sécrétion biliaire [15].

Mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet transcriptionnel de la diosgénine

Au niveau hépatique, la diosgénine induit l'expression des gènes ABCB1 et CYP2B10 (Cytochrome P450 2B10) mais aussi CYP3A11 (Cytochrome P450 3A11) (**Figure 4F**) comme précédemment montré [14]. Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et sont des cibles du récepteur nucléaire PXR (Pregnane X Receptor).

Afin de tester directement l'implication de PXR dans la réponse hypocholestérolémiant induite par la diosgénine chez la souris, nous avons mesuré l'excrétion fécale de cholestérol et le poids du foie chez des souris femelles déficientes en PXR nourries avec un régime supplémenté en diosgénine. Les souris sauvages soumises à un régime supplémenté en diosgénine présentent une quantité moyenne de cholestérol excrété dans les fèces supérieure aux souris nourries avec un régime standard de + 181%. Cet effet est maintenu (+130%) chez des souris déficientes en PXR (**Figure 5A**). Par ailleurs, le poids du foie des souris femelles sauvages et déficientes en PXR est très significativement augmenté par la diosgénine après 10 jours de régime (**Figure 5B**). Ensemble, ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol et l'hépatomégalie observées sous diosgénine ne sont pas dépendantes de PXR.

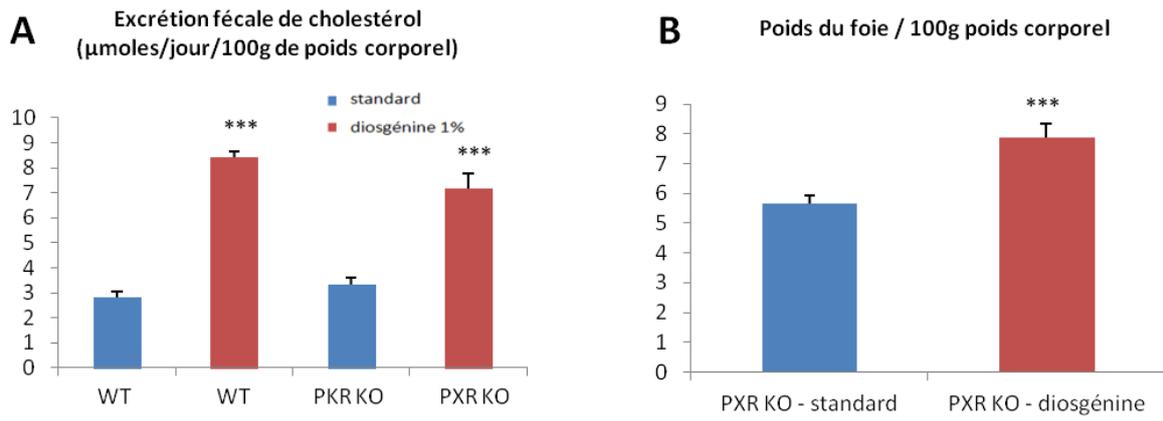


Figure 5 : Effet de la diosgénine sur (A) l'excrétion fécale de cholestérol et (B) le poids du foie chez des souris femelles sauvages (WT) et déficientes pour PXR (PXR KO). Les résultats sont représentés sous forme de moyennes \pm S.E.M., n = 5 dans chaque groupe.

DISCUSSION

La diosgénine est un stéroïde végétal qui présente des propriétés hypocholestérolémiantes dans de nombreux modèles [16][10][14]. Récemment, une étude s'est intéressée à ses mécanismes d'action et montre que la diosgénine réduit la cholestérolémie et stimule l'excrétion fécale de cholestérol via une réduction de l'absorption intestinale de cholestérol et une augmentation de l'excrétion biliaire de cholestérol [10]. L'objectif de cette étude est de caractériser l'effet d'un stéroïde végétal, la diosgénine, sur le TICE.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de la diosgénine sur des souris sauvages C57Bl/6 normocholestérolémiques. Nous avons confirmé l'effet hypocholestérolémiant de la diosgénine, déjà décrit chez des rats albinos mâles par Cayen *et al.* [8], chez des souris mâles CRJ :CD-1, par Uchida *et al.* [9] et chez des souris femelles C57Bl/6, par Temel *et al.* [10]. Contrairement à Uchida *et al.* qui observent une diminution de la prise alimentaire chez des souris nourries avec un régime contenant aussi 1% de diosgénine, en particulier en début de régime et une perte de poids significative de 8% par rapport aux souris contrôles [9], nous n'avons pas mis en évidence de modification du poids ni de prise alimentaire chez nos souris. Cette différence peut peut-être s'expliquer par le fait que nos souris ne sont pas du même fond génétique (CRJ :CD-1 vs C57BL6). Une autre cause possible est que la diosgénine utilisée est différente entre nos deux laboratoires. La diosgénine utilisée par l'équipe japonaise est pure à 83,5% (SDF 1767, Wako Chemical Industries, Japan,) alors que la diosgénine que nous avons utilisée est pure à 99% (D1643, Sigma-Aldrich, Germany). Nos données confirment également une augmentation significative de l'excrétion fécale de cholestérol chez les mâles et les femelles sauvages C57Bl/6 sous diosgénine. Chez les femelles, ces effets sont en partie attribuables à la réduction de l'absorption intestinale du cholestérol. Néanmoins, on observe à la fois chez les mâles et les femelles une tendance non significative à l'augmentation de l'excrétion biliaire et transintestinale de cholestérol tritié d'origine plasmatique. Il est important de noter que nos mesures de TICE sont réalisées sur une période de 2 heures après une injection intraveineuse de ³H cholestérol. Il serait intéressant de tester l'effet de la diosgénine sur une plus longue période chez des souris normocholestérolémiques présentant un défaut d'excrétion biliaire de cholestérol, notamment les souris transgéniques qui surexpriment NPC1L1 dans le foie. En effet, le métabolisme du cholestérol est décrit comme étant plus actif en période nocturne [17].

Chez les souris hypercholestérolémiques, nous mettons en avant un dimorphisme sexuel dans la réponse à la diosgénine. Les femelles LDLR KO sous diosgénine présentent une cholestérolémie réduite de 20% liée à une réduction massive du LDL cholestérol. En revanche, la diosgénine est sans effet sur la cholestérolémie des mâles LDLR KO. Pour cette raison, nous avons focalisé la suite de notre analyse sur les femelles. Ainsi, la diosgénine entraîne une stimulation de l'excrétion fécale de cholestérol en induisant à la fois une stimulation de l'excrétion transintestinale et biliaire de cholestérol tritié d'origine plasmatique et une réduction de l'absorption intestinale de cholestérol.

Ensemble, nos travaux confirment l'importance de la diosgénine sur la régulation de l'absorption intestinale de cholestérol. Temel *et al.* ont montré que cette réduction de l'absorption intestinale, associée à une stimulation de l'excrétion fécale du cholestérol était indépendante du transporteur NPC1L1 [10]. En accord avec ces

données, l'analyse transcriptionnelle de muqueuse intestinale de souris femelles sauvages ne montrent pas de modifications de l'expression de NPC1L1 ni de l'hétérodimère ABCG5/G8 qui permet l'efflux d'une partie du cholestérol nouvellement absorbé. La diosgénine étant un stérol végétal, son apport par voie orale via son incorporation dans l'alimentation pourrait conduire à un abaissement de la biodisponibilité du cholestérol pour le captage entérocytaire, possiblement via des mécanismes de compétitions pour l'incorporation aux micelles lipidiques. Ce type d'inhibition a été précédemment décrit pour expliquer l'effet hypocholestérolémiant des phytostérols [18].

Différentes études ont montré un effet stimulateur de la diosgénine sur l'excrétion biliaire de cholestérol associé à une baisse de l'excrétion des acides biliaires [9][10]. Dans nos expériences, nous avons quantifié la radioactivité associée à la bile sans dissocier le cholestérol des acides biliaires marqué au tritium. Chez les souris LDLR KO, la bile est significativement plus riche en ³H lorsque les souris sont nourries avec de la diosgénine. Ce n'est pas le cas des souris sauvages. Nous envisageons à présent d'extraire le ³H-cholestérol et les ³H-acides biliaires contenus dans la bile chez les souris sauvages et LDLR KO. Nos résultats et ceux d'autres équipes [12][14] ne montrent pas de modification de l'expression hépatique d'ABCG5 et d'ABCG8, qui sont les principaux transporteurs impliqués dans l'efflux biliaire du cholestérol [13]. Il est cependant intéressant de noter que l'expression d'ABCB1 est augmentée dans le foie des souris nourries avec de la diosgénine. ABCB1 a été récemment impliqué dans l'excrétion biliaire des acides biliaires [15].

Chez les souris femelles sauvages le TICE tend à être augmenté (+35%). Nous avons mesuré l'expression de plusieurs gènes pour déterminer si certains acteurs moléculaires pouvaient être impliqués dans cette modulation. Comme précédemment décrit, ni l'expression de NPC1L1 et ni celles d'ABCG5/G8 ne sont altérées par la diosgénine. En revanche, l'analyse de l'expression de gènes indique une augmentation de l'expression du LDLR et de la forme α d'ABCB1, deux gènes codants des protéines qui sont impliquées dans la voie du TICE [3]. Nous envisageons à présent de vérifier par Western-blot l'expression intestinale de ces deux protéines en réponse à la diosgénine. Si l'importance fonctionnelle d'ABCB1 dans les effets de la diosgénine reste à être pleinement définie, il semble que le LDLR ne soit pas indispensable. Le TICE est ainsi significativement activé chez des souris femelles LDLR KO.

Nous avons constaté, dans nos conditions expérimentales, que la diosgénine entraîne une augmentation marquée de la taille et du poids des foies. Aucune étude préalablement réalisée ne décrit un tel effet. Nos expériences préliminaires suggèrent que la diosgénine entraîne l'accumulation hépatique du cholestérol et des triglycérides. La stimulation de l'expression intestinale des gènes FAS et CD36 indique que l'hépatomégalie pourrait être en partie induite par une entrée excessive d'acides gras dans le foie et d'une synthèse endogène accrue. Ce résultat va à l'encontre d'une publication précédente qui suggérait que la diosgénine supprimait l'accumulation des triglycérides dans le foie de souris obèses et diabétiques KK-Ay [19]. Les auteurs suggéraient alors que la diosgénine pouvait inhiber la lipogenèse via une inhibition des récepteurs nucléaires LXR [19]. Enfin, il est intéressant de noter que la cycline D, qui joue un rôle dans la transition de la phase G1 à la phase S lors du cycle cellulaire, est également significativement induite sous diosgénine. Nous ne pouvons donc pas écarter complètement l'hypothèse que l'hyperplasie pourrait participer à l'hépatomégalie observée.

Si cette observation remet en cause l'utilisation de la diosgénine comme inducteur direct du TICE, il nous semble malgré tout important de découvrir les déterminants moléculaires impliqués dans son effet sur le TICE. Parmi la trentaine de gènes mesurés au niveau des tissus hépatiques et intestinaux, 5 gènes induits par la diosgénine sont connus pour être des gènes cibles du récepteur nucléaire PXR notamment les gènes clés du métabolisme des xénobiotiques CYP3A11 et ABCB1. En revanche, les récepteurs LXR et FXR ne semblent pas être responsables des effets transcriptionnels de la diosgénine. Il est également intéressant de noter que plusieurs travaux ont démontré que l'activation de PXR induit une accumulation de triglycérides dans le foie [20][21, p. 200]. Afin de tester l'importance fonctionnelle de PXR dans l'effet hypocholestérolémiant de la diosgénine, nous avons soumis des souris femelles sauvages et PXR KO à un régime enrichi en diosgénine. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'Hervé Guillou (Toxalim, UMR 1331, INRA Toulouse). Contrairement à nos attentes, la diosgénine est capable de stimuler l'excrétion fécale de cholestérol et d'induire l'hépatomégalie chez les souris femelles PXR KO.

Une découverte majeure de cette étude est ainsi la mise en évidence d'un dimorphisme sexuel sur l'excrétion transintestinale du cholestérol en condition standard et sous diosgénine chez des souris sauvages et déficientes en LDLR. Chez les souris sauvages sous régime standard, les femelles ont un TICE augmenté de plus de 50% par rapport aux mâles. Aussi, si l'effet hypocholestérolémiant de la diosgénine est marqué chez les femelles LDLR KO, il est absent chez les souris mâles hypercholestérolémiques. Le rôle des œstrogènes dans le métabolisme du cholestérol et la protection vis-à-vis de l'athérosclérose a été bien documenté (revue dans [22]). Toutefois, leur importance dans le TICE est totalement inconnue. La diosgénine a une structure moléculaire proche de celle des œstrogènes [23]. Yen *et al.* ont montré que la diosgénine est capable de se fixer et d'activer le récepteur aux œstrogènes ER α [24]. Au niveau hépatique, ER α a été relié au métabolisme du cholestérol notamment en intervenant dans la régulation de la sécrétion biliaire [25]. ER α est également exprimé au niveau intestinal [26]. Une activation du récepteur aux œstrogènes ER α par la diosgénine au niveau intestinal pourrait expliquer en partie les effets observés en particulier sur le TICE dans le cas où sa régulation dépendrait de l'activation de ce récepteur. Il est aussi envisageable que l'effet de la diosgénine soit conditionné par la présence d'hormones stéroïdiennes sexuelles.

Le TICE représente un nouvel espoir dans la lutte contre l'hypercholestérolémie et les pathologies cardiovasculaires associées. Si la diosgénine ne peut être utilisée directement comme inducteur du TICE en raison des effets néfastes décrit ci-dessus, nous pensons qu'il est toutefois important de mieux comprendre les acteurs et mécanismes moléculaires impliqués dans les effets de la diosgénine sur le TICE. Notre prochaine étape va consister à rechercher chez des femelles LDLR KO par une approche transcriptomique, des gènes dont l'expression hépatique et intestinale est affectée par la diosgénine. Enfin, du fait de nos récentes découvertes sur le rôle d'ABCB1 dans le TICE et sa régulation par la diosgénine, nous pensons qu'il pourrait être intéressant de déterminer si l'effet de la diosgénine est altéré chez les souris ABCB1 KO.

REFERENCES

- [1] A. E. van der Velde, C. L. J. Vrans, K. van den Oever, C. Kunne, R. P. J. Oude Elferink, F. Kuipers, et A. K. Groen, « Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice », *Gastroenterology*, vol. 133, n° 3, p. 967-975, sept. 2007.
- [2] J. N. van der Veen, T. H. van Dijk, C. L. J. Vrans, H. van Meer, R. Havinga, K. Bijsterveld, U. J. F. Tietge, A. K. Groen, et F. Kuipers, « Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 29, p. 19211-19219, juill. 2009.
- [3] C. Le May, J. M. Berger, A. Lespine, B. Pillot, X. Prieur, E. Letessier, M. M. Hussain, X. Collet, B. Cariou, et P. Costet, « Transintestinal Cholesterol Excretion Is an Active Metabolic Process Modulated by PCSK9 and Statin Involving ABCB1 », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, avr. 2013.
- [4] C. L. J. Vrans, A. E. van der Velde, K. van den Oever, J. H. M. Levels, S. Huet, R. P. J. Oude Elferink, F. Kuipers, et A. K. Groen, « Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux », *J. Lipid Res.*, vol. 50, n° 10, p. 2046-2054, oct. 2009.
- [5] A. E. van der Velde, C. L. J. Vrans, K. van den Oever, I. Seemann, R. P. J. Oude Elferink, M. van Eck, F. Kuipers, et A. K. Groen, « Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice », *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 295, n° 1, p. G203-G208, juill. 2008.
- [6] G. Brufau, F. Kuipers, Y. Lin, E. A. Trautwein, et A. K. Groen, « A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 6, p. e21576, 2011.
- [7] L. Jakulj, M. N. Vissers, C. P. van Roomen, J. N. van der Veen, C. L. J. Vrans, C. Kunne, F. Stellaard, J. J. P. Kastelein, et A. K. Groen, « Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice », *FEBS Letters*, vol. 584, n° 16, p. 3625-3628, août 2010.
- [8] M. N. Cayen et D. Dvornik, « Effect of diosgenin on lipid metabolism in rats », *J. Lipid Res.*, vol. 20, n° 2, p. 162-174, févr. 1979.
- [9] K. Uchida, H. Takase, Y. Nomura, K. Takeda, N. Takeuchi, et Y. Ishikawa, « Changes in biliary and fecal bile acids in mice after treatments with diosgenin and beta-sitosterol », *J. Lipid Res.*, vol. 25, n° 3, p. 236-245, mars 1984.
- [10] R. E. Temel, J. M. Brown, Y. Ma, W. Tang, L. L. Rudel, Y. A. Ioannou, J. P. Davies, et L. Yu, « Diosgenin stimulation of fecal cholesterol excretion in mice is not NPC1L1 dependent », *J. Lipid Res.*, vol. 50, n° 5, p. 915-923, mai 2009.
- [11] S. W. Altmann, H. R. Davis Jr, L.-J. Zhu, X. Yao, L. M. Hoos, G. Tetzloff, S. P. N. Iyer, M. Maguire, A. Golovko, M. Zeng, L. Wang, N. Murgolo, et M. P. Graziano, « Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption », *Science*, vol. 303, n° 5661, p. 1201-1204, févr. 2004.
- [12] L. Yu, S. Gupta, F. Xu, A. D. B. Liverman, A. Moschetta, D. J. Mangelsdorf, J. J. Repa, H. H. Hobbs, et J. C. Cohen, « Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 10, p. 8742-8747, mars 2005.
- [13] L. Yu, R. E. Hammer, J. Li-Hawkins, K. Von Bergmann, D. Lutjohann, J. C. Cohen, et H. H. Hobbs, « Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, n° 25, p. 16237-16242, déc. 2002.
- [14] A. Kusters, R. J. J. M. Frijters, C. Kunne, E. Vink, M. S. Schneiders, F. G. Schaap, C. P. Nibbering, S. B. Patel, et A. K. Groen, « Diosgenin-induced biliary cholesterol secretion in mice requires Abcg8 », *Hepatology*, vol. 41, n° 1, p. 141-150, janv. 2005.
- [15] S. D. Lee, S. J. Thornton, et Kishor M Wasan, « Volume 32, Issue 5 Supplement; May 2012 / Abstracts From the Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2012 Scientific Sessions: Abstract 282: Murine Abcb1 Functions as an Efflux Transporter for Bile Salts After Chronic Administration of a Western Diet -- Lee et al. 32 (5): A282 -- Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology ». [En ligne]. Disponible sur: http://atvb.ahajournals.org.gate2.inist.fr/cgi/content/meeting_abstract/32/5_MeetingAbstracts/A282?sid=c96fbd27-f379-406b-958f-3f8b62a3caa9. [Consulté le: 19-août-2013].
- [16] M. N. Cayen, E. S. Ferdinandi, E. Greselin, et D. Dvornik, « Studies on the disposition of diosgenin in rats, dogs, monkeys and man », *Atherosclerosis*, vol. 33, n° 1, p. 71-87, mai 1979.
- [17] F. Gachon et X. Bonnefont, « Circadian clock-coordinated hepatic lipid metabolism: only transcriptional regulation? », *Aging (Albany NY)*, vol. 2, n° 2, p. 101-106, 2010.
- [18] R. E. Ostlund, « Phytosterols in Human Nutrition », *Annual Review of Nutrition*, vol. 22, n° 1, p. 533-549, 2002.

- [19] T. Uemura, T. Goto, M.-S. Kang, N. Mizoguchi, S. Hirai, J.-Y. Lee, Y. Nakano, J. Shono, S. Hoshino, K. Taketani, N. Tsuge, T. Narukami, M. Makishima, N. Takahashi, et T. Kawada, « Diosgenin, the Main Aglycon of Fenugreek, Inhibits LXR α Activity in HepG2 Cells and Decreases Plasma and Hepatic Triglycerides in Obese Diabetic Mice », *J. Nutr.*, vol. 141, n $^{\circ}$ 1, p. 17-23, janv. 2011.
- [20] J. Zhou, Y. Zhai, Y. Mu, H. Gong, H. Uppal, D. Toma, S. Ren, R. M. Evans, et W. Xie, « A Novel Pregnane X Receptor-mediated and Sterol Regulatory Element-binding Protein-independent Lipogenic Pathway », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n $^{\circ}$ 21, p. 15013-15020, mai 2006.
- [21] M. Hoekstra, B. Lammers, R. Out, Z. Li, M. Van Eck, et T. J. C. Van Berkel, « Activation of the Nuclear Receptor PXR Decreases Plasma LDL-Cholesterol Levels and Induces Hepatic Steatosis in LDL Receptor Knockout Mice », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 6, n $^{\circ}$ 1, p. 182-189, févr. 2009.
- [22] J.-R. Nofer, « Estrogens and atherosclerosis: insights from animal models and cell systems », *J Mol Endocrinol*, vol. 48, n $^{\circ}$ 2, p. R13-R29, janv. 2012.
- [23] A. Scott, K. Higdon, M. Tucci, H. Benghuzzi, A. Puckett, A. Tsao, Z. Cason, et J. Hughes, « The prevention of osteoporotic progression by means of steroid loaded TCPL drug delivery systems », *Biomed Sci Instrum*, vol. 37, p. 13-18, 2001.
- [24] M. L. Yen, J. L. Su, C. L. Chien, K. W. Tseng, C. Y. Yang, W. F. Chen, C. C. Chang, et M. L. Kuo, « Diosgenin Induces Hypoxia-Inducible Factor-1 Activation and Angiogenesis through Estrogen Receptor-Related Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Osteoblasts », *Mol Pharmacol*, vol. 68, n $^{\circ}$ 4, p. 1061-1073, janv. 2005.
- [25] H. H. Wang, N. H. Afdhal, et D. Q.-H. Wang, « Estrogen receptor α , but not β , plays a major role in 17 β -estradiol-induced murine cholesterol gallstones », *Gastroenterology*, vol. 127, n $^{\circ}$ 1, p. 239-249, juill. 2004.
- [26] N. Kawano, T. Koji, Y. Hishikawa, K. Murase, I. Murata, et S. Kohno, « Identification and localization of estrogen receptor alpha- and beta-positive cells in adult male and female mouse intestine at various estrogen levels », *Histochem. Cell Biol.*, vol. 121, n $^{\circ}$ 5, p. 399-405, mai 2004.

DISCUSSION GENERALE

L'intestin est décrit depuis de nombreuses années comme un organe clé du métabolisme du cholestérol. Il assure l'absorption, le ré-empaquetage et la sécrétion dans la lymphe des lipides d'origine alimentaire sous forme de lipoprotéines à ApoB48, les chylomicrons. Depuis moins d'une dizaine d'années, des études sont venues préciser et renforcer le rôle de l'intestin dans le métabolisme du cholestérol. L'intestin, en plus du foie, est connu pour synthétiser et sécréter l'ApoAI, principale apolipoprotéine des HDL [374]. En 2006, Brunham *et al.* ont montré que des souris invalidées pour le transporteur ABCA1 spécifiquement au niveau intestinal présentaient une réduction de 30% de la concentration plasmatique en HDL cholestérol, indiquant que le transporteur ABCA1 est impliqué dans la formation des HDL au niveau intestinal [91]. En 2007, la publication de Van der Velde *et al.* dans le journal *Gastroenterology* a eu un impact majeur en mettant en évidence la capacité de l'intestin à excréter directement le cholestérol dans la lumière intestinale [14]. Plus tard, un autre travail a suggéré que chez des souris sauvages nourries avec un régime standard, le TICE permettait d'excréter deux fois plus de cholestérol que la voie « classique » biliaire [348].

Le TICE est une voie inductible (Cf. § 2.4.4). Au début de ma thèse, il a été troublant de constater que de nombreux travaux fondateurs montraient que le TICE était stimulé dans des modèles présentant une cholestérolémie élevée, c'est le cas des souris déficientes en SRB1 [349], des souris traités avec les agonistes du LXR [52][348] et des souris sous régimes hyperlipidiques [349]. Ceci pouvait suggérer que le TICE était un phénomène passif, une fuite de la barrière intestinale, dépendant de la concentration plasmatique en cholestérol. Les travaux de Lawrence Rudel du Wake Forest Institute ont montré pour la première fois que des souris avec une déficience hépatique en ACAT2 présentaient une réduction des concentrations circulantes en cholestérol associée à une augmentation de l'excrétion intestinale de cholestérol d'origine hépatique [345]. De notre côté, nous démontrons que le TICE est induit chez les souris déficientes en PCSK9 par rapport aux souris sauvages en dépit de leur hypocholestérolémie [375]. De même, le traitement de souris C57BL/6 avec un régime enrichi en statines réduit la cholestérolémie et stimule le TICE [375]. Ensemble, ces données suggèrent un mécanisme moléculaire nécessitant un transport actif du cholestérol depuis le captage du cholestérol circulant au niveau de la membrane basolatérale jusqu'à son efflux au niveau apical. La mise au point de la méthode de mesure du TICE *ex vivo* m'a permis d'apporter quelques arguments supplémentaires. Ainsi, nous avons mis en évidence qu'*ex vivo* le TICE était fortement réduit à 4°C par rapport au TICE mesuré à 37°C. Nous pensons que cette réduction est liée à un défaut de captage au niveau de la membrane basolatérale. Le contenu intestinal en cholestérol marqué était également fortement réprimé. On peut suggérer que deux mécanismes moléculaires peuvent rendre compte de ce fait : 1) un effet mécanique, il est connu que le froid a un effet sur la plasticité de la membrane cellulaire, la bicouche lipidique se rigidifie en réponse au froid entraînant une diminution de sa perméabilité et de sa résistance ; 2) un effet de la température sur l'ensemble des réactions biochimiques.

Toujours *ex vivo*, nous avons démontré l'importance de l'oxygénation sur le TICE. Le TICE est presque cinq fois supérieur lorsque le milieu d'incubation est oxygéné. Le bullage en oxygène des milieux au contact de l'explant

en chambre de Ussing permet l'apport en oxygène aux cellules [376]. L'apport en oxygène est nécessaire à la respiration cellulaire qui va conduire à la production d'ATP, molécule de stockage de l'énergie. L'ATP produite est indispensable à de nombreux processus cellulaires, dont le transport de molécules par les transporteurs ABC. Par la suite, nous avons renforcé ces résultats en mesurant le TICE après inhibition de la chaîne respiratoire par la roténone ou l'azoture de sodium et d'inhibiteurs du cytosquelette et du mécanisme d'internalisation du cholestérol tels que la cytochalasine D ou la dynasore. Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence de différence sur le TICE entre des explants traités et des explants contrôles en chambres de Ussing. Une des explications peut être liée au temps d'incubation des drogues avec l'explant (90 minutes) et au mode d'administration des drogues (directement dans le milieu, au contact de l'explant). Il serait intéressant de tester l'impact de ces drogues sur le TICE à travers une méthodologie différente, par exemple via une administration de la roténone par gavage [377] puis une mesure du TICE *in vivo* et *ex vivo*.

L'origine du cholestérol excrété par l'intestin a été la première question à laquelle j'ai tenté de répondre. La mise en évidence de l'existence du TICE a été réalisée après injection intraveineuse de cholestérol libre radioactif dilué dans une solution micellaire commerciale (Intralipid 20%) [14]. Cependant, cette technique ne permet pas de déterminer l'origine lipoprotéique du cholestérol. En effet, les micelles qui contiennent le cholestérol libre radiomarqué vont subir un remodelage au niveau du compartiment vasculaire soit en s'enrichissant d'ApoE soit via des échanges avec les lipoprotéines plasmatiques. En 2008, Brown *et al.* démontrent que des lipoprotéines d'origine hépatique enrichies en cholestérol radiomarquées sont capables de fournir du cholestérol au TICE [345]. Sur la base de cette étude, les auteurs émettent l'hypothèse que le foie joue un rôle central dans l'excrétion fécale de cholestérol en produisant des lipoprotéines qui seront excrétées par la voie intestinale.

Au cours de ma thèse, j'ai directement quantifié *ex vivo* et *in vivo* le TICE après avoir ajouté des quantités équivalentes de cholestérol tritié apporté par du LDL ou HDL cholestérol. Nos résultats, obtenus *in vivo* chez la souris et *ex vivo* chez l'homme, ne montrent pas de différence significative et suggèrent donc qu'à la fois les LDL et les HDL sont capables de fournir du cholestérol au TICE [375]. Si le rôle des lipoprotéines à ApoB dans le TICE est relativement bien accepté, l'implication des HDL reste en revanche beaucoup plus controversée. En effet, en 2012, Vrins et ses collaborateurs ont réfuté l'implication des HDL dans le TICE [350]. L'absence de données importantes comme l'activité spécifique de la source de HDL injectée rend impossible l'interprétation de leurs données. Néanmoins, il est curieux de noter que chez des souris sauvages, le ratio de l'excrétion biliaire par rapport à l'excrétion transintestinale de cholestérol marqué est comparable après injection de 3H chylomicrons ou d'HDL cholestérol. Ceci semble suggérer, de notre point de vue, que la faible activité de TICE mesurée après l'injection de HDL cholestérol est plus liée à la faiblesse de marquage de la source d'HDL utilisée qu'à une préférence de lipoprotéines.

Récemment, Temel *et al.* ont reporté dans un modèle de souris déficientes en MTP, une protéine essentielle à la lipodation et à la production des VLDL, que le TICE est diminué de plus de 50% [362]. Cette preuve indirecte

suggère que les lipoprotéines riches en TG pourraient également être impliquées dans l'approvisionnement en cholestérol de cette voie [345].

Le spectre des lipoprotéines pouvant initier le TICE semble donc regrouper aussi bien des particules à ApoB que des particules à ApoA1. Néanmoins, on ne connaît toujours pas l'importance et la place relative de chacune de ces lipoprotéines dans le TICE. Il serait intéressant de mettre en compétition plusieurs types de lipoprotéines différemment radiomarquées, *ex vivo* sur des explants intestinaux murins et humains en chambre de Ussing. De plus, nos expériences d'identification de l'implication des LDL et des HDL dans le TICE chez la souris ont été faites à partir de lipoprotéines humaines. Or, les lipoprotéines humaines et murines diffèrent en plusieurs points, notamment par leur composition, leur taille et leur rôle relatif [378]. L'utilisation de lipoprotéines murines radiomarquées permettrait de confirmer les résultats précédemment obtenus dans des conditions plus proches de la physiologie.

Lorsque j'ai commencé ma thèse, aucune étude n'avait évalué le rôle direct du LDLR sur le TICE. Selon Van der Velde *et al.* il ne semblait pas y avoir de corrélation entre l'augmentation du TICE par modulation nutritionnelle et l'expression intestinale du gène codant le LDLR [14]. Brown *et al.* avaient rapporté que l'excrétion intestinale du cholestérol dans les fèces était fonctionnelle chez les souris déficientes en LDLR, bien que son niveau par rapport à des souris sauvages n'ait pas été évalué [345]. Dans ce contexte et en m'appuyant sur mes travaux *in vivo* et *ex vivo* qui montrent que les LDL peuvent fournir du cholestérol pour le TICE, je me suis intéressé à l'implication de leur récepteur principal, le LDLR. J'ai mis en évidence que le LDLR est impliqué dans le TICE bien qu'il ne soit pas indispensable. En effet, chez les souris déficientes en PCSK9 qui surexpriment le LDLR au niveau intestinal, le TICE est augmenté. La dégradation en aiguë du LDLR par l'injection de PCSK9 exogène diminue le TICE, a contrario, de façon plutôt surprenante, le TICE n'est pas modifié voire tend à être augmenté chez les souris déficientes en LDLR, conséquence d'une augmentation du captage des LDL au niveau intestinal. De façon intéressante, contrairement aux souris sauvages, le TICE n'est pas augmenté suite à un traitement avec de la lovastatine chez des souris déficientes en LDLR. Ceci suggère que soit l'augmentation du TICE chez les souris sauvages passe par une augmentation de l'expression du LDLR consécutive à un traitement avec des statines, soit que dans nos conditions, les souris déficientes en LDLR ont un TICE à son niveau maximal, ne nous permettant pas de mettre en évidence l'effet stimulateur des statines. Nos travaux de recherche évaluant l'effet de la diosgénine sur le TICE peuvent en partie éclaircir ce résultat. Nous avons montré que chez des souris déficientes en LDLR, le TICE peut être augmenté suite à une addition de diosgénine dans la nourriture. Le TICE peut donc être stimulé chez des souris déficientes en LDLR suggérant alors que la non induction de l'excrétion transintestinale par les statines chez ces animaux est due à un effet lié au LDLR plutôt qu'à l'atteinte d'un plateau pour le TICE. En conséquence, le TICE qui est actif et inductible par la diosgénine en l'absence du LDLR, passe par une voie indépendante de ce récepteur. Les acteurs moléculaires qui compensent l'absence du LDLR dans le TICE issu des LDL sont encore inconnus. Plusieurs récepteurs liés au captage des lipoprotéines peuvent être envisagés, notamment d'autres membres de la famille du LDLR sont susceptibles de participer au TICE.

Le récepteur LRP1 (Cf. § 2.2.3), qui est exprimé dans l'intestin [174] peut lier l'ApoE [175]; ce qui indique que ce récepteur jouerait un rôle dans l'endocytose des lipoprotéines portant de l'ApoE [176][177]. En condition standard, LRP1 n'a pas d'affinité pour l'ApoB des LDL [86]. Néanmoins, les souris déficientes en LDLR présentent une accumulation de l'ApoE dans le plasma et notamment sur les LDL [379][380]. Aussi, Zhao *et al.* dans une étude de 2011 montrent que les souris double knock-out pour SRB1 et ABCA1 sont hypocholestérolémiques, principalement à cause d'une baisse drastique du HDL cholestérol. Ces souris présentent également une baisse du LDL cholestérol, en partie due à une augmentation de l'expression protéique de LRP1 [225]. De façon intéressante, ces souris qui présentent un RCT macrophagique dépendant des HDL quasi nul ont une excrétion fécale de cholestérol similaire aux souris sauvages. On peut alors émettre l'hypothèse que la diminution du LDL cholestérol et l'excrétion fécale normale de cholestérol peuvent être liées à un mécanisme de compensation via une augmentation de la voie du LDL-TICE face à une voie de retour du cholestérol par les HDL inopérantes. Par ailleurs, les résultats publiés par Vrins *et al.* suggèrent que le TICE est présent chez ces souris bien que la mesure ait été faite suite à l'injection de HDL radiomarquées [350]. Il serait alors intéressant d'évaluer le TICE à partir de LDL radiomarquées chez des animaux doubles knock-out pour le LDLR et LRP1 afin de mettre en évidence une réduction du TICE chez ces souris par rapport à des souris simple LDLR KO.

Le VLDLR (Cf. § 2.2.3) se lie à l'ApoE mais pas à l'ApoB100 et il peut être dégradé par PCSK9 [381]. Il est exprimé dans de nombreux tissus dont l'intestin grêle [180]. Sur le même principe que pour le captage des particules par le LRP1, les LDL peuvent potentiellement se charger en ApoE chez les souris déficientes en LDLR et permettre ainsi au VLDLR de jouer un rôle compensatoire.

Enfin, le cholestérol issu des LDL pourrait être capté par d'autres récepteurs non liés à la famille du LDLR comme la Sortiline 1 (Cf. § 2.2.3) qui est exprimée au niveau de l'intestin grêle chez l'homme [382].

Par ailleurs, Stein *et al.* montrent dans une étude évaluant l'effet d'un anticorps monoclonal anti-PCSK9 (AMG 145) chez des patients FH homozygotes que le LDL cholestérol est réduit dans le sous-groupe de patients présentant un LDLR défectueux mais pas dans le sous-groupe de patients étant négatifs pour le LDLR. Cependant, les patients négatifs pour le LDLR présentent un effet plus marqué de l'anticorps anti-PCSK9 sur la lipoprotéine (a) (Lp(a)) très athérogène. Il serait intéressant de déterminer si la Lp(a) et ces potentiels récepteurs potentiels sont impliqués dans le TICE.

A l'heure actuelle, seul le LDLR à clairement été identifié dans cette voie même s'il n'est pas limitant. *In vivo*, la mesure du TICE par la méthode de cannulation suite à l'injection de LDL cholestérol radiomarqué dans des modèles de souris simple KO pour le VLDLR ou le LRP1 et doublement invalidés pour le LDLR et le VLDLR ou le LRP1 permettrait de déterminer leur implication directe.

Après le transport intracellulaire du cholestérol, l'étape finale du TICE correspond à l'efflux du cholestérol à travers la membrane apicale, vers la lumière intestinale. Nos résultats montrent qu'en plus d'ABCG5/G8, ABCB1 est impliqué dans l'excrétion transintestinale du cholestérol au niveau de la membrane apicale des entérocytes. ABCB1 ou P-glycoprotéine est un transporteur de type flippase. Connue aussi sous le nom de

multidrug resistance 1 (MDR 1), cette pompe exporte des substrats lipophiles du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche phospholipidique. Il est localisé dans la membrane plasmique, plus précisément au niveau des radeaux lipidiques et des cavéoles ainsi que dans les membranes du noyau, du RE et de l'appareil de Golgi [383][384]. ABCB1 est principalement exprimé au niveau du foie et de l'intestin et de façon moins importante dans le cerveau, le cœur et certaines cellules sanguines [385]. Dans l'intestin, ABCB1 est exprimé au niveau de la bordure en brosse des entérocytes [385]. Ce transporteur est principalement étudié pour son implication dans la résistance à de nombreux traitements médicamenteux comme par exemple les hypolipémiants, les anticancéreux et les antirétroviraux [386][387][388]. Cette résistance varie en corrélation avec le niveau d'expression d'ABCB1, dépendant de phénomènes d'induction ou d'inhibition. Les substrats d'ABCB1 conditionnent son intérêt physiologique. Ainsi, les PL et le cholestérol de la membrane cellulaire ainsi que les hormones stéroïdiennes peuvent transiter par ce transporteur. Formé de la fusion de deux demi-structures homologues, cet homodimère de 1280 acides aminés est composé pour chaque séquence homologue d'un domaine transmembranaire et d'un domaine de liaison à l'ATP. ABCB1 a un polymorphisme qui peut avoir un effet sur l'expression ou l'activité du transporteur [389]. Chez l'homme, la variabilité interindividuelle de l'expression d'ABCB1 est forte. Il a été rapporté que la concentration d'ABCB1 peut varier d'un facteur 50 dans le foie [389]. Ainsi, on note une association entre la réponse aux traitements médicamenteux et le polymorphisme d'ABCB1. Par ailleurs, il existe un lien entre le niveau de cholestérol plasmique et le polymorphisme du gène ABCB1 [390][391]. L'équipe dirigé par Anne Lespine, avec qui nous avons collaboré, a montré que les souris déficientes pour les deux isoformes d'ABCB1 (ABCB1a et ABCB1b) développent spontanément un diabète, une stéatose hépatique tardive, une obésité et une augmentation de la concentration plasmique en HDL cholestérol [392].

In vivo, nous avons montré que le TICE est réduit de 26% chez des souris déficientes en ABCB1. Ex vivo, l'inhibition pharmacologique d'ABCB1 réduit significativement le TICE des souris contrôles mais est sans effet sur les souris déficientes en ABCB1. Ainsi, si les knock-out indépendants d'ABCG5 et d'ABCB1 induisent respectivement une réduction du TICE de 40% et 26%, une part de l'efflux apical du cholestérol reste inexpliquée. La mesure du TICE dans un modèle de souris double déficientes pour ABCG5 et ABCB1 puis une analyse en microarray des gènes modulés par rapport à des souris contrôles pourrait permettre l'identification de nouveaux acteurs de l'efflux du cholestérol.

Le TICE est une voie modulable. Elle est ainsi contrôlée par des récepteurs nucléaires, des molécules endogènes et des agents pharmacologiques (Cf. § 2.4.4). J'ai montré chez des souris sauvages nourries pendant 10 jours avec un régime contenant 0.02% de lovastatine que la cholestérolémie est réduite, principalement par une baisse marquée du HDL cholestérol et que le TICE est fortement induit. Le même protocole chez des souris déficientes en LDLR conduit à une baisse de la cholestérolémie mais ne modifie pas le TICE. Ainsi, les statines stimulent le TICE et cet effet est en partie médié par le LDLR. La mise à jour de nouveaux mécanismes d'action des statines pouvant contribuer à l'activation de l'efflux et à l'élimination du cholestérol plasmique en excès

est donc important au regard de leur utilisation. Actuellement, les statines représentent la classe pharmaceutique la plus utilisée en clinique pour le traitement des hypercholestérolémies (HAS, 2010).

Comme nous l'avons mis en évidence, le TICE est augmenté en absence de PCSK9 et les LDL peuvent fournir du cholestérol pour cette voie [375]. Dans le contexte actuel, ces résultats sont très excitants car ils suggèrent une fuite du cholestérol proathérogène, entre autre via le LDLR. Présentement, les études cliniques en cours sur l'utilisation d'anticorps anti-PCSK9 chez l'homme donnent de très bons résultats en termes de sécurité, de tolérance et de réduction du LDL cholestérol, aussi bien en monothérapie qu'en association avec des statines [168][169][170][171][172] (Cf. § 2.2.2.2.2 point *PCSK9, une nouvelle cible thérapeutique*). Ainsi, l'impact sur le TICE de la neutralisation de PCSK9 via l'injection d'anticorps anti-PCSK9 dans le plasma des souris serait extrêmement intéressant. Ceci pourrait ce faire chez des souris sauvages via l'injection de LDL radiomarquées comme source de cholestérol, en addition ou non à un traitement avec des statines.

Par ailleurs, je montre que la diosgénine, un composé hypocholestérolémiant naturellement présent dans diverses plantes appartenant au genre *Dioscorea*, induit faiblement le TICE chez des souris sauvages et augmente significativement le TICE chez les souris femelles déficientes en LDLR. Dans cette étude, je mets en évidence un dimorphisme sexuel sur le TICE chez les souris sauvages C57Bl/6 aussi bien que LDLR KO.

Le dimorphisme sexuel que nous avons observé sur le TICE chez des souris sauvages fait ressortir des mécanismes potentiels de régulation de cette voie métabolique. Il a été mis en évidence que l'activation des récepteurs aux œstrogènes induit une baisse de la cholestérolémie, notamment sur le LDL cholestérol [393]. Au niveau hépatique chez l'homme et le rat, l'expression du LDLR est positivement régulée par un traitement aux œstrogènes [394][395]. L'éthinylœstradiol qui est un dérivé de l'œstradiol, réprime l'expression hépatique de PCSK9 chez le rat et augmente l'expression protéique du LDLR [145]. Chez la femme, les œstrogènes induisent une augmentation du HDL cholestérol [396] et une baisse de la concentration plasmatique en PCSK9 et en LDL cholestérol mais ne modifient pas la synthèse des acides biliaires [147]. De plus, les récepteurs aux œstrogènes ont été montrés pour avoir une influence sur l'expression de différents transporteurs du cholestérol au niveau intestinal [397]. Dans ce contexte, on peut supposer que le dimorphisme sexuel observé sur le niveau de TICE est dû à l'activation des récepteurs aux œstrogènes. Pour tester cette hypothèse, des souris ovariectomisées implantées ou non avec un pellet diffusant de l'œstradiol feront l'objet d'une mesure du TICE via une méthode de cannulation intestinale.

Nous montrons que l'excrétion transintestinale du cholestérol et l'excrétion biliaire du cholestérol tendent à être augmentées chez des souris sauvages sous diosgénine par rapport à des souris sous régime standard. Or, la diosgénine a été montrée être un activateur exogène de PDIA3 (Protein Disulfide, isomerase family A, number 3 ou ERp57). Cette enzyme de 58 kD est présente au niveau de la membrane cellulaire [398] mais aussi au niveau du RE [399] dans des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial cells). Elle est également exprimée dans l'intestin grêle et dans la lignée de cellules IEC-6 qui sont des cellules intestinales de rat [400]. PDIA3 est impliquée dans le métabolisme des protéines notamment en induisant des modifications post-

transcriptionnelles [401]. Elle permettrait également le transport de molécules dans la cellule. De façon intéressante, une des protéines à avoir été identifiées pour interagir avec PDIA3 est le LDLR [402]. Il a été montré *in vitro* sur des fibroblastes murins et humains que PDIA3 est impliquée dans le repliement oxydatif du LDLR dans le RE [401]. Dans ce contexte, une part des effets de la diosgénine sur le TICE pourrait être liée à une activation de PDIA3, avec une implication directe ou indirecte de cette enzyme dans le TICE. Néanmoins, nous avons montré que le TICE est le plus fortement augmenté chez les souris femelles déficientes en LDLR, suggérant que les effets de la diosgénine sur le TICE n'impliquent potentiellement pas seulement l'action de PDIA3 sur le LDLR.

L'étude du TICE chez la souris permet d'obtenir de précieuses données pour pouvoir passer à son étude chez l'homme. Cependant, la souris est dépourvue de CETP. Comme nous l'avons vu précédemment (Cf. § 2.3.2.4.4), la CETP permet le transfert de cholestérol estérifié des HDL vers les LDL et VLDL en échange de triglycérides. Elle est transportée dans le plasma par les lipoprotéines de haute densité et permet le remodelage permanent des lipoprotéines circulantes. Le profil lipoprotéique est donc très différent entre l'homme et la souris. Chez la souris, 80 à 90% du cholestérol plasmatique est transporté par les HDL alors que chez l'homme, le cholestérol est principalement transporté par les LDL. Cette distribution différente du cholestérol plasmatique pourrait avoir une influence, notamment dans l'importance relative du TICE issu des LDL proathérogènes par rapport au TICE issu des HDL antiathérogènes. De plus, comparé à l'homme, les souris ont une plus grande surface relative au niveau de l'épithélium intestinal [403]. La quantité de cholestérol excrété par la voie transintestinale chez la souris et chez l'homme est donc susceptible de varier en fonction de la surface relative de l'épithélium intestinal.

Dans deux études évaluant l'origine du cholestérol présent au sein de la lumière intestinale chez l'homme [346][347], les auteurs notent qu'une part importante du cholestérol présent dans la lumière provient directement de l'intestin. Chez deux patients ayant une hypercholestérolémie familiale, les mêmes observations ont été faites [404]. Néanmoins, il n'est pas possible de distinguer clairement l'origine du cholestérol excrété par l'intestin : desquamation cellulaire ou excrétion active du cholestérol par l'intestin. Nous avons apporté la première preuve directe de l'existence du TICE chez l'homme sur des explants intestinaux humains provenant de chirurgie bariatrique (by-pass du jéjunum). La mesure du TICE *ex vivo* sur ces explants humains incubés avec des lipoprotéines de type LDL ou HDL montre que le TICE est présent à un état non induit. Lorsque ces explants sont stimulés dans le compartiment luminal avec des accepteurs de cholestérol, un mélange d'acides biliaires et des phospholipides, le TICE issu des LDL et HDL est augmenté. Nous montrons donc pour la première fois que le TICE est modulable *ex vivo* chez l'homme et que, comme il a été démontré chez la souris, aussi bien les LDL que les HDL peuvent fournir du cholestérol pour cette voie métabolique. *Ex vivo*, cette voie est donc inductible, ce qui représente un formidable espoir thérapeutique chez les patients à haut risque CV n'atteignant pas leur objectif thérapeutique. L'étape suivante sera de valider l'existence du TICE *in vivo* chez l'homme. Toutefois, cette étude directe soulève des difficultés et pourra se faire

à l'aide de méthodes plus ou moins invasives afin de discriminer le cholestérol excrété par la voie hépatique ou transintestinale. Une méthode relativement simple pour mesurer le TICE chez l'homme passe par le recrutement de patients ayant une tumeur du pancréas avec une obstruction totale de l'excrétion biliaire. Une des limites de cette méthode est le recrutement des patients. Ces patients sont rares (environ 10 000 cas/an, chiffre INSERM 2010), souvent âgés et dans un état de santé général qui rend difficile leur participation à un protocole de recherche clinique (qui est sans impact direct sur l'amélioration de leur qualité de vie). Une autre possibilité serait une mesure du TICE sur des volontaires sains via l'utilisation d'un tube à trois lumières comme précédemment décrit [347]. Des études de cinétique du cholestérol avec le calcul de la contribution relative des différentes voies d'excrétion peuvent également permettre d'évaluer la part relative du TICE dans l'excrétion fécale du cholestérol. Ces techniques nécessitent toutes le recours à l'utilisation de radio-isotopes stables. Les premiers résultats communiqués par l'équipe de A. Groen indiquent que le cholestérol ayant pour origine le TICE pourrait représenter environ 30% du cholestérol retrouvé dans les fèces (ISA Mars 2012, Sydney, Abstract n°274, Jakulj *et al.*, 2012).

La relevance physiologique du TICE reste encore floue. Cette voie est décrite comme une voie intestinale d'élimination du cholestérol complémentaire à la voie biliaire [343]. Il a été mis en évidence qu'elle est majeure chez la souris et c'est certainement là son principal rôle physiologique : l'efflux du cholestérol en excès de l'organisme. Cependant, cette voie a t'elle un rôle additionnel à l'élimination du cholestérol, comme la bile qui a un rôle dans la lumière intestinale en favorisant la formation de micelles pour l'absorption lipidique.

Les acides biliaires sécrétés via le canal cholédoque au niveau de la partie proximale de l'intestin ont des propriétés détersives et sont relativement toxiques pour les cellules [405][406]. Leur niveau est donc étroitement régulé par le récepteur nucléaire FXR. Dial *et al.* ont montré que la phosphatidylcholine peut directement protéger la membrane des cellules des effets toxiques des acides biliaires via son rôle dans la formation des micelles mixtes au sein de la lumière intestinale, limitant de fait les propriétés toxiques de acides biliaires [407]. Selon le même principe, le cholestérol entrant dans la formation des micelles mixtes [408], il est envisageable que le TICE permette un apport constant en cholestérol dans la lumière intestinale afin de limiter les effets détersifs et toxiques des acides biliaires sur les cellules de l'épithélium.

L'étude publié par Van der Veen *et al.* évaluant la contribution relative des différentes voies d'élimination du cholestérol dans les fèces met en avant que 33% du cholestérol provient du TICE et que 17% à une origine biliaire [348]. De façon surprenante, nos résultats montrent une excrétion biliaire du cholestérol radiomarqué dix fois plus faible dans les perfusats intestinaux par rapport à la bile suite à une injection de LDL cholestérol radiomarqué par voie intraveineuse. Ce ratio de 1:10 a été retrouvé par Vrins *et al.* lors de la mesure du TICE et de l'excrétion biliaire de cholestérol chez des animaux déficients en ABCA1 ou SRB1. Plusieurs éléments peuvent en partie expliquer cette différence. Les techniques employées sont différentes. Vrins *et al.* et nous-mêmes avons utilisé une méthode de dérivation biliaire puis de cannulation intestinale pour la mesure de l'excrétion biliaire et du TICE. Cette méthode intègre l'injection intraveineuse d'un bolus de cholestérol induisant une augmentation drastique de la cholestérolémie. On peut alors émettre l'hypothèse que le foie

joue un rôle de tampon face à cet afflux massif de cholestérol en aigu, stimulant son excrétion biliaire. Van der Veen *et al.* ont utilisé une méthode de suivi du cholestérol radiomarqué avec différents radio-isotopes stables couplée à des études de cinétique. Cette méthode diffère de la précédente notamment vis-à-vis du temps de mesure qui est de deux heures via la méthode de cannulation et sur une dizaine de jours via la méthode des traceurs stables.

A partir des études de l'équipe de Groen, il est devenu évident, au moins chez la souris, que la part principale du cholestérol éliminée dans les fèces provient directement du compartiment plasmatique, sans passer par le foie. Se pose alors la question de l'implication de cette voie dans le RCT macrophagique. Les études disponibles concluent à des effets opposés sur l'importance de la voie biliaire dans le RCT macrophagique [373][371][372]. Quelques points sont cependant à noter pour mieux envisager ces résultats apparemment contradictoires. Les modèles chirurgicaux proposés par Nijstad *et al.* et Temel *et al.* ne permettent pas d'étudier le TICE-RCT dans des conditions physiologiques. En effet, l'absence de sécrétion biliaire dans la lumière intestinale a des conséquences majeures sur le métabolisme du cholestérol au niveau intestinal. De plus, l'utilisation d'un modèle de ligature du canal biliaire [371] a le désavantage d'induire une cholestase, contrairement à un modèle de dérivation biliaire [372] bien que dans les deux cas, le cycle entéro-hépatique des acides biliaires soit rompu. En plus de ces modèles chirurgicaux, les modèles génétiques utilisés ont un impact plus ou moins important sur la composition biliaire et l'absorption intestinale (présence ou non des PL dans la bile). En outre, l'origine des macrophages utilisés pour les mesures de RCT est différente (lignée cellulaire J774 [372], macrophages péritonéaux [371][373]). De plus, aucune de ces études ne permet de discriminer le cholestérol radiomarqué issu d'un transport actif à travers l'épithélium intestinal de la desquamation cellulaire. Ces quelques points ne peuvent toutefois expliquer qu'une part des différences observées. Bien qu'il semble tout de même que la voie biliaire et la voie non biliaire soient interconnectées, le débat reste ouvert quant à l'implication du TICE dans le RCT et des études complémentaires, utilisant des approches méthodologiques différentes, sont nécessaires. Sur ce, il serait intéressant de mesurer le TICE de façon directe avec la technique de cannulation couplée à la technique de mesure du RCT macrophagique chez des souris sauvages et ayant un TICE activé.

Finalement, y a-t-il un lien entre le TICE et l'athérosclérose ? L'augmentation du TICE peut-elle prévenir et réduire l'athérosclérose ? Il n'y a aujourd'hui aucune réponse directe à cette question. Toutefois, il a été montré que l'activation spécifique de LXR dans l'intestin via une modulation pharmacologique (GW6340) ou génétique (souris iVP16/LXR α) induit une baisse de l'absorption intestinale du cholestérol, améliore le profil lipoprotéique des souris et augmente le RCT [313][68]. L'activation intestinale constitutive ou via un agoniste spécifique induit une augmentation de l'expression d'ABCA1 et d'ABCG5/G8 spécifiquement dans l'intestin mais pas dans le foie [309][313]. Chez ces animaux, l'excrétion fécale de cholestérol est fortement augmentée. Ces effets ont été observés en l'absence d'une stéatose hépatique qui est classiquement observée avec des agonistes systémiques de LXR tel que le T0901317 [310]. De plus, les souris déficientes en LDLR traitées avec un

agoniste spécifique de LXR dans l'intestin sont protégées de l'athérosclérose [313]. Ces travaux mettent ainsi en avant le rôle majeur de l'intestin dans l'homéostasie du cholestérol et le potentiel thérapeutique de l'activation de LXR spécifiquement au niveau intestinal pour le traitement des maladies CV. Ces résultats posent également la question de l'importance du TICE dans la réponse à l'activation spécifique de LXR α dans l'intestin dans la mesure où ni l'augmentation de l'excrétion biliaire ni la baisse de l'absorption intestinale ne peuvent expliquer l'augmentation importante de l'excrétion fécale du cholestérol. Qui plus est, l'activation de LXR stimule le TICE [348]. De ce fait, ce modèle serait très intéressant pour déterminer si l'activation du TICE protège de l'athérosclérose.

Le tableau ci-dessous résume les principaux acteurs et modulateurs connus de l'excrétion transintestinale du cholestérol, notre contribution est surligné en vert (**tableau 5**).

Acteur moléculaire testé (<i>in vivo</i>)		Modèle de souris (mâles)	TICE	Réf.
Origine du cholestérol	Intralipide 20%	FVB	Présent	[349][14] [350]
		C57Bl/6	Présent	Article 2
	Emulsion riche en TG	FVB	Présent	[375]
		C57Bl/6	Présent	[350]
	VLDL	MTP ^{-/-}	- 50%	[362]
	LDL	C57Bl/6	Présent	
LDL	C57Bl/6	Présent	[375]	
	HDL	SRB1 ^{-/-} x ABCA1 ^{-/-}	Présent (faible?)	[350]
Récepteurs de la membrane basolatérale	LDLR	LDLR ^{-/-}	Tend à être augmenté	[375]
		PCSK9 ^{-/-}	+ 62%	[375]
	SRB1	SRB1 ^{-/-}	+ 100%	[349]
		SRB1 ^{-/-}	Pas d'effet	[350][351]
		NPC1L1 ^{Foie Tg} x SRB1 ^{Intestin Tg}	Pas d'effet	[351]
ABCA1	ABCA1 ^{-/-}	- 45%	[350]	
Protéines intracellulaires	ACAT2	ACAT2 ^{-/-}	+ 200%	[345]
		Oligonucléotide antisens ACAT2	+ 200%	[345]
	Rab8/9	FVB	/	[354]
	LimpII	FVB	/	[354]

Transporteurs de la membrane apicale	SRB1	SRB1 ^{-/-}	+ 100%	[349]
		NPC1L1 ^{Foie Tg} x SRB1 Intestin Tg	Pas d'effet	[351]
	NPC1L1	FVB ± ézétimibe	Pas d'effet	[354]
		C57Bl/6 ± ézétimibe	+ 100%	[363]
	ABCG5/G8	ABCG5 ^{-/-}	- 40%	[348]
		ABCG8 ^{-/-}	Pas d'effet	[14]
ABCB1	ABCB1 ^{-/-}	- 26%	[375]	
	FVB ± PSC833	>- 50%	[375]	
Agents pharmacologiques modulateurs	PCSK9 recombinante	PCSK9 ^{-/-}	- 35%	[375]
		LDLR ^{-/-}	Pas d'effet	[375]
	Lovastatine	C57Bl/6	+ 71%	[375]
		LDLR ^{-/-}	Pas d'effet	[375]
	Ezétimibe	FVB	Pas d'effet	[354]
		C57Bl/6	+ 100%	[363]
	Agoniste de LXR	ABCB4 ^{-/-}	+ 66%	[52]
		C57Bl/6	+ 91%	[348]
Agoniste de PPAR delta	FVB	+ 70%	[354]	
Modulateurs nutritionnels	Jeûne	12H de jeûn FVB	- 28%	[366]
		48H de jeûn FVB	+ 50%	[366]
	Régime gras	FVB	+ 100%	[349]
	Régime Western	FVB	+ 50%	[349]
	Régime riche en cholestérol	FVB	Pas d'effet	[349]
	Phytostérols	ABCG5 ^{+/+}	+ 500%	[367]
		ABCG5 ^{-/-}	+ 250%	[367]
	Diosgénine	C57Bl/6	Tend à être augmenté	Article 2
LDLR ^{-/-}		Pas d'effet	Article 2	
LDLR ^{-/-} femelles		+ 53%	Article 2	
Agents de la lumière intestinale	Pas d'accepteur	FVB	Présent	[14][349]
	Taurocholate	FVB	+ 150%	[14]
	Phosphatidylcholine	FVB	+ 400%	[14]
	TC/PC	FVB	+ 100%	[14][349]
Implication dans le RCT		ABCB4 ^{-/-}	Non impliqué	[371]
		NPC1L1 ^{Foie Tg}	Impliqué	[372]
		NPC1L1 ^{-/-} x NPC1L1 ^{Foie Tg}	Non impliqué	[373]

Tableau 5. Tableau récapitulatif des acteurs et modulateurs connus du TICE

BIBLIOGRAPHIE

- [1] « OMS | Statistiques sanitaires mondiales 2013 », WHO. [En ligne]. Disponible sur: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2013/fr/index.html. [Consulté le: 25-juill-2013].
- [2] A. AOUBA, F. PEQUIGNOT, A. LE TOULLEC, E. JOUGLA, et Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.). Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès. (C.E.P.I.D.C.). Le Ve Vesinet. FRA, « Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004. », *BULLETIN EPIDEMIOLOGIQUE HEBDOMADAIRE*, n° 35-36, p. 308-314, 2007.
- [3] « OMS | Maladies cardio-vasculaires ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/index.html>. [Consulté le: 13-sept-2011].
- [4] R. Ross, « Atherosclerosis--an inflammatory disease », *N. Engl. J. Med.*, vol. 340, n° 2, p. 115-126, janv. 1999.
- [5] P. Libby, « Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes », *Circulation*, vol. 104, n° 3, p. 365-372, juill. 2001.
- [6] J. Ferrières, V. Bongard, J. Dallongeville, D. Arveiler, D. Cottel, B. Haas, A. Wagner, P. Amouyel, et J.-B. Ruidavets, « Trends in plasma lipids, lipoproteins and dyslipidaemias in French adults, 1996-2007 », *Arch Cardiovasc Dis*, vol. 102, n° 4, p. 293-301, avr. 2009.
- [7] J. J. Brugts, T. Yetgin, S. E. Hoeks, A. M. Gotto, J. Shepherd, R. G. J. Westendorp, A. J. M. de Craen, R. H. Knopp, H. Nakamura, P. Ridker, R. van Domburg, et J. W. Deckers, « The benefits of statins in people without established cardiovascular disease but with cardiovascular risk factors: meta-analysis of randomised controlled trials », *BMJ*, vol. 338, p. b2376-b2376, juin 2009.
- [8] C. Baigent, A. Keech, P. M. Kearney, L. Blackwell, G. Buck, C. Pollicino, A. Kirby, T. Sourjina, R. Peto, R. Collins, et R. Simes, « Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins », *Lancet*, vol. 366, n° 9493, p. 1267-1278, oct. 2005.
- [9] C. Baigent, L. Blackwell, J. Emberson, L. E. Holland, C. Reith, N. Bhala, R. Peto, E. H. Barnes, A. Keech, J. Simes, et R. Collins, « Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials », *Lancet*, vol. 376, n° 9753, p. 1670-1681, nov. 2010.
- [10] J. Ferrières, E. Bérard, O. Crisan, et V. Bongard, « Residual dyslipidaemia after statin treatment in France: Prevalence and risk distribution », *Arch Cardiovasc Dis*, vol. 103, n° 5, p. 302-309, mai 2010.
- [11] A. L. Catapano, Z. Reiner, G. De Backer, I. Graham, M.-R. Taskinen, O. Wiklund, S. Agewall, E. Alegria, M. J. Chapman, P. Durrington, S. Erdine, J. Halcox, R. Hobbs, J. Kjekshus, P. P. Filardi, G. Riccardi, R. F. Storey, et D. Wood, « ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) », *Atherosclerosis*, vol. 217, n° 1, p. 3-46, juill. 2011.
- [12] P. Costet, M. Krempf, et B. Cariou, « PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 33, n° 9, p. 426-434, sept. 2008.
- [13] M. Farnier, « PCSK9 inhibitors », *Current Opinion in Lipidology*, vol. 24, n° 3, p. 251-258, juin 2013.
- [14] A. E. van der Velde, C. L. J. Vrans, K. van den Oever, C. Kunne, R. P. J. Oude Elferink, F. Kuipers, et A. K. Groen, « Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice », *Gastroenterology*, vol. 133, n° 3, p. 967-975, sept. 2007.
- [15] E. Ikonen, « Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, n° 2, p. 125-138, févr. 2008.
- [16] J. W. GOFMAN, F. T. LINDGREN, et H. ELLIOTT, « Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum », *J. Biol. Chem.*, vol. 179, n° 2, p. 973-979, juin 1949.
- [17] J. W. GOFMAN, L. RUBIN, J. P. MCGINLEY, et H. B. JONES, « Hyperlipoproteinemia », *Am. J. Med.*, vol. 17, n° 4, p. 514-520, oct. 1954.
- [18] M. J. Chapman, « Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects », *J. Lipid Res.*, vol. 21, n° 7, p. 789-853, sept. 1980.
- [19] N. E. Miller et G. J. Miller, « Letter: High-density lipoprotein and atherosclerosis », *Lancet*, vol. 1, n° 7914, p. 1033, mai 1975.
- [20] T. Gordon, W. P. Castelli, M. C. Hjortland, W. B. Kannel, et T. R. Dawber, « High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study », *Am. J. Med.*, vol. 62, n° 5, p. 707-714, mai 1977.

- [21] B. F. Voight, G. M. Peloso, M. Orho-Melander, R. Frikke-Schmidt, M. Barbalic, M. K. Jensen, G. Hindy, H. Hólm, E. L. Ding, T. Johnson, H. Schunkert, N. J. Samani, R. Clarke, J. C. Hopewell, J. F. Thompson, M. Li, G. Thorleifsson, C. Newton-Cheh, K. Musunuru, J. P. Pirruccello, D. Saleheen, L. Chen, A. F. R. Stewart, A. Schillert, U. Thorsteinsdottir, G. Thorgeirsson, S. Anand, J. C. Engert, T. Morgan, J. Spertus, M. Stoll, K. Berger, N. Martinelli, D. Girelli, P. P. McKeown, C. C. Patterson, S. E. Epstein, J. Devaney, M.-S. Burnett, V. Mooser, S. Ripatti, I. Surakka, M. S. Nieminen, J. Sinisalo, M.-L. Lokki, M. Perola, A. Havulinna, U. de Faire, B. Gigante, E. Ingelsson, T. Zeller, P. Wild, P. I. W. de Bakker, O. H. Klungel, A.-H. Maitland-van der Zee, B. J. M. Peters, A. de Boer, D. E. Grobbee, P. W. Kamphuisen, V. H. M. Deneer, C. C. Elbers, N. C. Onland-Moret, M. H. Hofker, C. Wijmenga, W. M. M. Verschuren, J. M. A. Boer, Y. T. van der Schouw, A. Rasheed, P. Frossard, S. Demissie, C. Willer, R. Do, J. M. Ordovas, G. R. Abecasis, M. Boehnke, K. L. Mohlke, M. J. Daly, C. Guiducci, N. P. Burt, A. Surti, E. Gonzalez, S. Purcell, S. Gabriel, J. Marrugat, J. Peden, J. Erdmann, P. Diemert, C. Willenborg, I. R. König, M. Fischer, C. Hengstenberg, A. Ziegler, I. Buyschaert, D. Lambrechts, F. Van de Werf, K. A. Fox, N. E. El Mokhtari, D. Rubin, J. Schrezenmeir, S. Schreiber, A. Schäfer, J. Danesh, S. Blankenberg, R. Roberts, R. McPherson, H. Watkins, A. S. Hall, K. Overvad, E. Rimm, E. Boerwinkle, A. Tybjaerg-Hansen, L. A. Cupples, M. P. Reilly, O. Melander, P. M. Mannucci, D. Ardisino, D. Siscovick, R. Elosua, K. Stefansson, C. J. O'Donnell, V. Salomaa, D. J. Rader, L. Peltonen, S. M. Schwartz, D. Altshuler, et S. Kathiresan, « Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study », *Lancet*, vol. 380, n° 9841, p. 572-580, août 2012.
- [22] J.-F. Toussaint, *L'athérosclérose: physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques*. Elsevier Masson, 2003.
- [23] A. Gustafson, P. Alaupovic, et R. H. Furman, « Studies of the composition and structure of serum lipoproteins. Separation and characterization of phospholipid-protein residues obtained by partial delipidization of very low density lipoproteins of human serum », *Biochemistry*, vol. 5, n° 2, p. 632-640, févr. 1966.
- [24] K. Zhang et R. J. Kaufman, « Unfolding the toxicity of cholesterol », *Nat Cell Biol*, vol. 5, n° 9, p. 769-770, sept. 2003.
- [25] L. Liscum, R. D. Cummings, R. G. Anderson, G. N. DeMartino, J. L. Goldstein, et M. S. Brown, « 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase: a transmembrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum with N-linked "high-mannose" oligosaccharides », *PNAS*, vol. 80, n° 23, p. 7165-7169, janv. 1983.
- [26] J. D. Horton, J. L. Goldstein, et M. S. Brown, « SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 109, n° 9, p. 1125-1131, mai 2002.
- [27] J. D. Horton, N. A. Shah, J. A. Warrington, N. N. Anderson, S. W. Park, M. S. Brown, et J. L. Goldstein, « Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes », *PNAS*, vol. 100, n° 21, p. 12027-12032, oct. 2003.
- [28] J. L. Goldstein, R. A. DeBose-Boyd, et M. S. Brown, « Protein sensors for membrane sterols », *Cell*, vol. 124, n° 1, p. 35-46, janv. 2006.
- [29] F. Fougère, B. Hegarty, A. Bobard, I. Hainault, P. Bossard, et P. Ferré, « Un nouveau rôle de l'insuline dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique », *M/S: médecine sciences*, vol. 21, n° 6-7, p. 569-571, 2005.
- [30] B.-L. Song, N. B. Javitt, et R. A. DeBose-Boyd, « Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol », *Cell Metab.*, vol. 1, n° 3, p. 179-189, mars 2005.
- [31] N. Sever, B.-L. Song, D. Yabe, J. L. Goldstein, M. S. Brown, et R. A. DeBose-Boyd, « Insig-dependent Ubiquitination and Degradation of Mammalian 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase Stimulated by Sterols and Geranylgeraniol », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 52, p. 52479-52490, déc. 2003.
- [32] R. A. DeBose-Boyd, J. Ou, J. L. Goldstein, et M. S. Brown, « Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, n° 4, p. 1477, févr. 2001.
- [33] Y. Kanfi, V. Peshti, R. Gil, S. Naiman, L. Nahum, E. Levin, N. Kronfeld-Schor, et H. Y. Cohen, « SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity », *Aging Cell*, vol. 9, n° 2, p. 162-173, avr. 2010.
- [34] R. Tao, X. Xiong, R. A. DePinho, C.-X. Deng, et X. C. Dong, « Hepatic SREBP-2 and cholesterol biosynthesis are regulated by FoxO3 and Sirt6 », *J. Lipid Res.*, juill. 2013.

- [35] K. Zhang, L. Li, Y. Qi, X. Zhu, B. Gan, R. A. DePinho, T. Averitt, et S. Guo, « Hepatic suppression of Foxo1 and Foxo3 causes hypoglycemia and hyperlipidemia in mice », *Endocrinology*, vol. 153, n° 2, p. 631-646, févr. 2012.
- [36] T. J. Marquart, R. M. Allen, D. S. Ory, et Á. Baldán, « miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters », *PNAS*, vol. 107, n° 27, p. 12228-12232, juin 2010.
- [37] T. Horie, K. Ono, M. Horiguchi, H. Nishi, T. Nakamura, K. Nagao, M. Kinoshita, Y. Kuwabara, H. Marusawa, Y. Iwanaga, K. Hasegawa, M. Yokode, T. Kimura, et T. Kita, « MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo », *PNAS*, vol. 107, n° 40, p. 17321-17326, mai 2010.
- [38] R. M. Allen, T. J. Marquart, C. J. Albert, F. J. Suchy, D. Q.-H. Wang, M. Ananthanarayanan, D. A. Ford, et A. Baldán, « miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity », *EMBO Mol Med*, vol. 4, n° 9, p. 882-895, sept. 2012.
- [39] G. D. Norata, F. Sala, A. L. Catapano, et C. Fernández-Hernando, « MicroRNAs and lipoproteins: A connection beyond atherosclerosis? », *Atherosclerosis*, vol. 227, n° 2, p. 209-215, avr. 2013.
- [40] K. J. Rayner, F. J. Sheedy, C. C. Esau, F. N. Hussain, R. E. Temel, S. Parathath, J. M. van Gils, A. J. Rayner, A. N. Chang, Y. Suarez, C. Fernandez-Hernando, E. A. Fisher, et K. J. Moore, « Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 121, n° 7, p. 2921-2931, juill. 2011.
- [41] M. Neunlist, L. Van Landeghem, M. M. Mahé, P. Derkinderen, S. B. des Varannes, et M. Rolli-Derkinderen, « The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease », *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 10, n° 2, p. 90-100, févr. 2013.
- [42] M. Schemann et M. Neunlist, « The human enteric nervous system », *Neurogastroenterology & Motility*, vol. 16, p. 55–59, 2004.
- [43] N. MCINTYRE, C. D. HOLDSWORTH, et D. S. TURNER, « NEW INTERPRETATION OF ORAL GLUCOSE TOLERANCE », *Lancet*, vol. 2, n° 7349, p. 20-21, juill. 1964.
- [44] W. Kim et J. M. Egan, « The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment », *Pharmacol Rev*, vol. 60, n° 4, p. 470-512, janv. 2008.
- [45] M. S. Bosner, L. G. Lange, W. F. Stenson, et R. E. Ostlund Jr, « Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry », *J. Lipid Res.*, vol. 40, n° 2, p. 302-308, févr. 1999.
- [46] H. R. Davis Jr et S. W. Altmann, « Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1791, n° 7, p. 679-683, juill. 2009.
- [47] B. Bonamassa et A. Moschetta, « Atherosclerosis: lessons from LXR and the intestine », *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 24, n° 3, p. 120-128, mars 2013.
- [48] D. Q.-H. Wang, « Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption », *Annual Review of Physiology*, vol. 69, n° 1, p. 221-248, 2007.
- [49] P. J. Voshol, M. Schwarz, A. Rigotti, M. Krieger, A. K. Groen, et F. Kuipers, « Down-regulation of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) expression in rodents under conditions of deficient bile delivery to the intestine », *Biochem. J.*, vol. 356, n° Pt 2, p. 317-325, juin 2001.
- [50] M. Ponz de Leon, P. Loria, R. Iori, et N. Carulli, « Cholesterol absorption in cirrhosis: the role of total and individual bile acid pool size », *Gastroenterology*, vol. 80, n° 6, p. 1428-1437, juin 1981.
- [51] D. Q.-H. Wang, S. Tazuma, D. E. Cohen, et M. C. Carey, « Feeding natural hydrophilic bile acids inhibits intestinal cholesterol absorption: studies in the gallstone-susceptible mouse », *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 285, n° 3, p. G494-502, sept. 2003.
- [52] J. K. Kruit, T. Plösch, R. Havinga, R. Boverhof, P. H. E. Groot, A. K. Groen, et F. Kuipers, « Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice », *Gastroenterology*, vol. 128, n° 1, p. 147-156, janv. 2005.
- [53] H. H. Wang, N. H. Afdhal, S. J. Gendler, et D. Q.-H. Wang, « Lack of the intestinal Muc1 mucin impairs cholesterol uptake and absorption but not fatty acid uptake in Muc1^{-/-} mice », *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 287, n° 3, p. G547-554, sept. 2004.
- [54] S. W. Altmann, H. R. Davis Jr, L.-J. Zhu, X. Yao, L. M. Hoos, G. Tetzloff, S. P. N. Iyer, M. Maguire, A. Golovko, M. Zeng, L. Wang, N. Murgolo, et M. P. Graziano, « Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption », *Science*, vol. 303, n° 5661, p. 1201-1204, févr. 2004.
- [55] M. Garcia-Calvo, J. Lisnock, H. G. Bull, B. E. Hawes, D. A. Burnett, M. P. Braun, J. H. Crona, H. R. Davis Jr, D. C. Dean, P. A. Detmers, M. P. Graziano, M. Hughes, D. E. Macintyre, A. Ogawa, K. A. O'neill, S. P. N. Iyer, D. E.

- Shevell, M. M. Smith, Y. S. Tang, A. M. Makarewicz, F. Ujjainwalla, S. W. Altmann, K. T. Chapman, et N. A. Thornberry, « The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 102, n° 23, p. 8132-8137, juin 2005.
- [56] Y. Nakashima, A. S. Plump, E. W. Raines, J. L. Breslow, et R. Ross, « ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 14, n° 1, p. 133-140, janv. 1994.
- [57] H. R. Davis Jr, L. M. Hoos, G. Tetzloff, M. Maguire, L. Zhu, M. P. Graziano, et S. W. Altmann, « Deficiency of Niemann-Pick C1 Like 1 prevents atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, n° 4, p. 841-849, avr. 2007.
- [58] L. Cai, E. R. M. Eckhardt, W. Shi, Z. Zhao, M. Nasser, W. J. S. de Villiers, et D. R. van der Westhuyzen, « Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells », *J. Lipid Res.*, vol. 45, n° 2, p. 253-262, févr. 2004.
- [59] H. Hauser, J. H. Dyer, A. Nandy, M. A. Vega, M. Werder, E. Bieliauskaite, F. E. Weber, S. Compassi, A. Gemperli, D. Boffelli, E. Wehrli, G. Schulthess, et M. C. Phillips, « Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine », *Biochemistry*, vol. 37, n° 51, p. 17843-17850, déc. 1998.
- [60] F. Bietrix, D. Yan, M. Nauze, C. Rolland, J. Bertrand-Michel, C. Coméra, S. Schaak, R. Barbaras, A. K. Groen, B. Perret, F. Tercé, et X. Collet, « Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 11, p. 7214-7219, mars 2006.
- [61] P. Mardones, V. Quiñones, L. Amigo, M. Moreno, J. F. Miquel, M. Schwarz, H. E. Miettinen, B. Trigatti, M. Krieger, S. VanPatten, D. E. Cohen, et A. Rigotti, « Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice », *J. Lipid Res.*, vol. 42, n° 2, p. 170-180, janv. 2001.
- [62] H. Poirier, P. Degrace, I. Niot, A. Bernard, et P. Besnard, « Localization and Regulation of the Putative Membrane Fatty-Acid Transporter (FAT) in the Small Intestine », *European Journal of Biochemistry*, vol. 238, n° 2, p. 368-373, 1996.
- [63] F. Nassir, B. Wilson, X. Han, R. W. Gross, et N. A. Abumrad, « CD36 Is Important for Fatty Acid and Cholesterol Uptake by the Proximal but Not Distal Intestine », *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n° 27, p. 19493-19501, juin 2007.
- [64] A. M. Nauli, F. Nassir, S. Zheng, Q. Yang, C. Lo, S. B. VonLehmden, D. Lee, R. J. Jandacek, N. A. Abumrad, et P. Tso, « CD36 Is Important for Chylomicron Formation and Secretion and May Mediate Cholesterol Uptake in the Proximal Intestine », *Gastroenterology*, vol. 131, n° 4, p. 1197-1207, oct. 2006.
- [65] D. V. Nguyen, V. A. Drover, M. Knopfel, P. Dhanasekaran, H. Hauser, et M. C. Phillips, « Influence of class B scavenger receptors on cholesterol flux across the brush border membrane and intestinal absorption », *J. Lipid Res.*, vol. 50, n° 11, p. 2235-2244, nov. 2009.
- [66] J. J. Repa et D. J. Mangelsdorf, « The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis », *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 16, n° 1, p. 459-481, 2000.
- [67] B. A. Janowski, P. J. Willy, T. R. Devi, J. R. Falck, et D. J. Mangelsdorf, « An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha », *Nature*, vol. 383, n° 6602, p. 728-731, oct. 1996.
- [68] D. Peng, R. A. Hiipakka, Q. Dai, J. Guo, C. A. Reardon, G. S. Getz, et S. Liao, « Antiatherosclerotic Effects of a Novel Synthetic Tissue-Selective Steroidal Liver X Receptor Agonist in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice », *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 327, n° 2, p. 332-342, janv. 2008.
- [69] A. C. Calkin et P. Tontonoz, « Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR », *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, mars 2012.
- [70] L. Yu, J. Li-Hawkins, R. E. Hammer, K. E. Berge, J. D. Horton, J. C. Cohen, et H. H. Hobbs, « Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol », *J. Clin. Invest.*, vol. 110, n° 5, p. 671-680, sept. 2002.
- [71] T. Heinemann, G. A. Kullak-Ublick, B. Pietruck, et K. von Bergmann, « Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol », *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 40 Suppl 1, p. S59-63, 1991.
- [72] K. E. Berge, H. Tian, G. A. Graf, L. Yu, N. V. Grishin, J. Schultz, P. Kwiterovich, B. Shan, R. Barnes, et H. H. Hobbs, « Accumulation of Dietary Cholesterol in Sitosterolemia Caused by Mutations in Adjacent ABC Transporters », *Science*, vol. 290, n° 5497, p. 1771-1775, janv. 2000.
- [73] C. Duval, V. Touche, A. Tailleux, J.-C. Fruchart, C. Fievet, V. Clavey, B. Staels, et S. Lestavel, « Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 340, n° 4, p. 1259-1263, févr. 2006.

- [74] T. Lemberger, B. Desvergne, et W. Wahli, « PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS: A Nuclear Receptor Signaling Pathway in Lipid Physiology », *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 12, n° 1, p. 335-363, 1996.
- [75] E. Z. Amri, F. Bonino, G. Ailhaud, N. A. Abumrad, et P. A. Grimaldi, « Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors », *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n° 5, p. 2367-2371, févr. 1995.
- [76] J. N. van der Veen, J. K. Kruit, R. Havinga, J. F. W. Baller, G. Chimini, S. Lestavel, B. Staels, P. H. E. Groot, A. K. Groen, et F. Kuipers, « Reduced cholesterol absorption upon PPAR δ activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1 », *J. Lipid Res.*, vol. 46, n° 3, p. 526-534, janv. 2005.
- [77] R. E. Ostlund, « Phytosterols in Human Nutrition », *Annual Review of Nutrition*, vol. 22, n° 1, p. 533-549, 2002.
- [78] I. Demonty, R. T. Ras, H. C. M. van der Knaap, G. S. M. J. E. Duchateau, L. Meijer, P. L. Zock, J. M. Geleijnse, et E. A. Trautwein, « Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake », *J. Nutr.*, vol. 139, n° 2, p. 271-284, févr. 2009.
- [79] M. B. Katan, S. M. Grundy, P. Jones, M. Law, T. Miettinen, et R. Paoletti, « Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels », *Mayo Clin. Proc.*, vol. 78, n° 8, p. 965-978, août 2003.
- [80] S. S. Abumweis, R. Barake, et P. J. H. Jones, « Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials », *Food Nutr Res*, vol. 52, 2008.
- [81] W.-S. He, C.-S. Jia, Y.-B. Yang, Y. Ma, X.-M. Zhang, B. Feng, et J. Jin, « Cholesterol-lowering effects of plant sterol and steryl laurate by oral administration in mice », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, n° 9, p. 5093-5099, mai 2011.
- [82] B. Staels, Y. Handelsman, et V. Fonseca, « Bile Acid Sequestrants for Lipid and Glucose Control », *Current Diabetes Reports*, vol. 10, n° 1, p. 70-77, janv. 2010.
- [83] K. R. Norum, T. Berg, P. Helgerud, et C. A. Drevon, « Transport of cholesterol », *Physiol. Rev.*, vol. 63, n° 4, p. 1343-1419, oct. 1983.
- [84] M. M. Hussain, J. Shi, et P. Dreizen, « Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly », *J. Lipid Res.*, vol. 44, n° 1, p. 22-32, janv. 2003.
- [85] R. Zechner, « The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism », *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 8, n° 2, p. 77-88, avr. 1997.
- [86] M. M. Hussain, D. K. Strickland, et A. Bakillah, « The Mammalian Low-Density Lipoprotein Receptor Family », *Annual Review of Nutrition*, vol. 19, n° 1, p. 141-172, 1999.
- [87] D. C. Rubinsztein, J. C. Cohen, G. M. Berger, D. R. van der Westhuyzen, G. A. Coetzee, et W. Gevers, « Chylomicron remnant clearance from the plasma is normal in familial hypercholesterolemic homozygotes with defined receptor defects », *J. Clin. Invest.*, vol. 86, n° 4, p. 1306-1312, oct. 1990.
- [88] A. Rohlmann, M. Gotthardt, R. E. Hammer, et J. Herz, « Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 101, n° 3, p. 689-695, févr. 1998.
- [89] R. Out, M. Hoekstra, S. C. A. de Jager, P. de Vos, D. R. van der Westhuyzen, N. R. Webb, M. V. Eck, E. A. L. Biessen, et T. J. C. V. Berkel, « Adenovirus-mediated hepatic overexpression of scavenger receptor class B type I accelerates chylomicron metabolism in C57BL/6J mice », *J. Lipid Res.*, vol. 46, n° 6, p. 1172-1181, janv. 2005.
- [90] J. Iqbal et M. M. Hussain, « Evidence for multiple complementary pathways for efficient cholesterol absorption in mice », *J. Lipid Res.*, vol. 46, n° 7, p. 1491-1501, janv. 2005.
- [91] L. R. Brunham, « Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, n° 4, p. 1052-1062, mars 2006.
- [92] J.-K. Kruit, A. K. Groen, T. J. van Berkel, et F. Kuipers, « Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism », *World J. Gastroenterol.*, vol. 12, n° 40, p. 6429-6439, oct. 2006.
- [93] G. S. Shelness et J. A. Sellers, « Very-low-density lipoprotein assembly and secretion », *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 12, n° 2, p. 151-157, avr. 2001.
- [94] B. H.-J. Chang, W. Liao, L. Li, M. Nakamuta, D. Mack, et L. Chan, « Liver-specific Inactivation of the Abetalipoproteinemia Gene Completely Abrogates Very Low Density Lipoprotein/Low Density Lipoprotein Production in a Viable Conditional Knockout Mouse », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 10, p. 6051-6055, mai 1999.
- [95] M. Pan, J. Liang, E. A. Fisher, et H. N. Ginsberg, « The Late Addition of Core Lipids to Nascent Apolipoprotein B100, Resulting in the Assembly and Secretion of Triglyceride-rich Lipoproteins, Is Independent

- of Both Microsomal Triglyceride Transfer Protein Activity and New Triglyceride Synthesis », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 6, p. 4413-4421, août 2002.
- [96] S. Santamarina-Fojo, H. González-Navarro, L. Freeman, E. Wagner, et Z. Nong, « Hepatic Lipase, Lipoprotein Metabolism, and Atherogenesis », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 24, n° 10, p. 1750-1754, janv. 2004.
- [97] A. Tall, E. Granot, R. Brocia, I. Tabas, C. Hesler, K. Williams, et M. Denke, « Accelerated transfer of cholesteryl esters in dyslipidemic plasma. Role of cholesteryl ester transfer protein », *J. Clin. Invest.*, vol. 79, n° 4, p. 1217-1225, avr. 1987.
- [98] L. G. Fong, E. Bonney, J. C. Kosek, et A. D. Cooper, « Immunohistochemical localization of low density lipoprotein receptors in adrenal gland, liver, and intestine », *J. Clin. Invest.*, vol. 84, n° 3, p. 847-856, sept. 1989.
- [99] D. Sviridov, J. M. Hoeg, T. Eggerman, S. J. Demosky, I. G. Safonova, et H. B. Brewer, « Low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein A-I and B expression in human enterocytes », *Digestion*, vol. 67, n° 1-2, p. 67-70, 2003.
- [100] R. Milne, R. Théolis, R. Maurice, R. J. Pease, P. K. Weech, E. Rassart, J. C. Fruchart, J. Scott, et Y. L. Marcel, « The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. », *J. Biol. Chem.*, vol. 264, n° 33, p. 19754-19760, nov. 1989.
- [101] K. H. Weisgraber, T. L. Innerarity, K. J. Harder, R. W. Mahley, R. W. Milne, Y. L. Marcel, et J. T. Sparrow, « The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding. », *J. Biol. Chem.*, vol. 258, n° 20, p. 12348-12354, oct. 1983.
- [102] H. Jeon et S. C. Blacklow, « Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, p. 535-562, 2005.
- [103] M. S. Brown et J. L. Goldstein, « A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis », *Science*, vol. 232, n° 4746, p. 34-47, avr. 1986.
- [104] D. Lopez, « PCSK9: An enigmatic protease », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1781, n° 4, p. 184-191, avr. 2008.
- [105] D. M. Waterworth, S. L. Ricketts, K. Song, L. Chen, J. H. Zhao, S. Ripatti, Y. S. Aulchenko, W. Zhang, X. Yuan, N. Lim, J. Luan, S. Ashford, E. Wheeler, E. H. Young, D. Hadley, J. R. Thompson, P. S. Braund, T. Johnson, M. Struchalin, I. Surakka, R. Luben, K.-T. Khaw, S. A. Rodwell, R. J. F. Loos, S. M. Boekholdt, M. Inouye, P. Deloukas, P. Elliott, D. Schlessinger, S. Sanna, A. Scuteri, A. Jackson, K. L. Mohlke, J. Tuomilehto, R. Roberts, A. Stewart, Y. A. Kesäniemi, R. W. Mahley, S. M. Grundy, Wellcome Trust Case Control Consortium, W. McArdle, L. Cardon, G. Waeber, P. Vollenweider, J. C. Chambers, M. Boehnke, G. R. Abecasis, V. Salomaa, M.-R. Järvelin, A. Ruukonen, I. Barroso, S. E. Epstein, H. H. Hakonarson, D. J. Rader, M. P. Reilly, J. C. M. Witteman, A. S. Hall, N. J. Samani, D. P. Strachan, P. Barter, C. M. van Duijn, J. S. Kooner, L. Peltonen, N. J. Wareham, R. McPherson, V. Mooser, et M. S. Sandhu, « Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, n° 11, p. 2264-2276, nov. 2010.
- [106] L. Zhang, K. Reue, L. G. Fong, S. G. Young, et P. Tontonoz, « Feedback Regulation of Cholesterol Uptake by the LXR-IDOL-LDLR Axis », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 32, n° 11, p. 2541-2546, janv. 2012.
- [107] C. Hong, S. Duit, P. Jalonen, R. Out, L. Scheer, V. Sorrentino, R. Boyadjian, K. W. Rodenburg, E. Foley, L. Korhonen, D. Lindholm, J. Nimpf, T. J. C. van Berkel, P. Tontonoz, et N. Zelcer, « The E3 ubiquitin ligase IDOL induces the degradation of the low density lipoprotein receptor family members VLDLR and ApoER2 », *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n° 26, p. 19720-19726, juin 2010.
- [108] N. Zelcer, C. Hong, R. Boyadjian, et P. Tontonoz, « LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor », *Science*, vol. 325, n° 5936, p. 100-104, juill. 2009.
- [109] M. Varret, J. P. Rabès, B. Saint-Jore, A. Cenarro, J. C. Marinoni, F. Civeira, M. Devillers, M. Krempf, M. Coulon, R. Thiart, M. J. Kotze, H. Schmidt, J. C. Buzzi, G. M. Kostner, S. Bertolini, M. Pocovi, A. Rosa, M. Farnier, M. Martinez, C. Junien, et C. Boileau, « A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32 », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 64, n° 5, p. 1378-1387, mai 1999.
- [110] M. Abifadel, M. Varret, J.-P. Rabès, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, C. Cruaud, S. Benjannet, L. Wickham, D. Erlich, A. Derré, L. Villéger, M. Farnier, I. Beucler, E. Bruckert, J. Chambaz, B. Chanu, J.-M. Lecerf, G. Luc, P. Moulin, J. Weissenbach, A. Prat, M. Krempf, C. Junien, N. G. Seidah, et C. Boileau, « Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia », *Nat. Genet.*, vol. 34, n° 2, p. 154-156, juin 2003.
- [111] N. G. Seidah, S. Benjannet, L. Wickham, J. Marcinkiewicz, S. B. Jasmin, S. Stifani, A. Basak, A. Prat, et M. Chretien, « The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 100, n° 3, p. 928-933, févr. 2003.

- [112] S. N. Chen, C. M. Ballantyne, A. M. Gotto Jr, Y. Tan, J. T. Willerson, et A. J. Marian, « A common PCSK9 haplotype, encompassing the E670G coding single nucleotide polymorphism, is a novel genetic marker for plasma low-density lipoprotein cholesterol levels and severity of coronary atherosclerosis », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 45, n° 10, p. 1611-1619, mai 2005.
- [113] B. Cariou, C. Le May, et P. Costet, « Clinical aspects of PCSK9 », *Atherosclerosis*, vol. 216, n° 2, p. 258-265, juin 2011.
- [114] J. Cohen, A. Pertsemlidis, I. K. Kotowski, R. Graham, C. K. Garcia, et H. H. Hobbs, « Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9 », *Nat. Genet.*, vol. 37, n° 2, p. 161-165, févr. 2005.
- [115] D. Cunningham, D. E. Danley, K. F. Geoghegan, M. C. Griffor, J. L. Hawkins, T. A. Subashi, A. H. Varghese, M. J. Ammirati, J. S. Culp, L. R. Hoth, M. N. Mansour, K. M. McGrath, A. P. Seddon, S. Shenolikar, K. J. Stutzman-Engwall, L. C. Warren, D. Xia, et X. Qiu, « Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia », *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 14, n° 5, p. 413-419, mai 2007.
- [116] S. Benjannet, D. Rhainds, R. Essalmani, J. Mayne, L. Wickham, W. Jin, M.-C. Asselin, J. Hamelin, M. Varret, D. Allard, M. Trillard, M. Abifadel, A. Tebon, A. D. Attie, D. J. Rader, C. Boileau, L. Brisette, M. Chrétien, A. Prat, et N. G. Seidah, « NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 47, p. 48865-48875, nov. 2004.
- [117] T. Dewpura, A. Raymond, J. Hamelin, N. G. Seidah, M. Mbikay, M. Chrétien, et J. Mayne, « PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans », *FEBS J.*, vol. 275, n° 13, p. 3480-3493, juill. 2008.
- [118] X.-W. Chen, H. Wang, K. Bajaj, P. Zhang, Z.-X. Meng, D. Ma, Y. Bai, H.-H. Liu, E. Adams, A. Baines, G. Yu, M. A. Sartor, B. Zhang, Z. Yi, J. Lin, S. G. Young, R. Schekman, et D. Ginsburg, « SEC24A deficiency lowers plasma cholesterol through reduced PCSK9 secretion », *Elife*, vol. 2, p. e00444, 2013.
- [119] R. A. Debose-Boyd et J. D. Horton, « Opening up new fronts in the fight against cholesterol », *Elife*, vol. 2, p. e00663, 2013.
- [120] A. Zaid, A. Roubtsova, R. Essalmani, J. Marcinkiewicz, A. Chamberland, J. Hamelin, M. Tremblay, H. Jacques, W. Jin, J. Davignon, N. G. Seidah, et A. Prat, « Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration », *Hepatology*, vol. 48, n° 2, p. 646-654, 2008.
- [121] Z. Zhao, Y. Tuakli-Wosornu, T. A. Lagace, L. Kinch, N. V. Grishin, J. D. Horton, J. C. Cohen, et H. H. Hobbs, « Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 79, n° 3, p. 514-523, sept. 2006.
- [122] T. Kosenko, M. Golder, G. Leblond, W. Weng, et T. A. Lagace, « Low density lipoprotein binds to proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK9) in human plasma and inhibits PCSK9-mediated low density lipoprotein receptor degradation », *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n° 12, p. 8279-8288, mars 2013.
- [123] M. T. Lipari, W. Li, P. Moran, M. Kong-Beltran, T. Sai, J. Lai, S. J. Lin, G. Kolumam, J. Zavala-Solorio, A. Izrael-Tomasevic, D. Arnott, J. Wang, A. S. Peterson, et D. Kirchhofer, « Furin-cleaved Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Is Active and Modulates Low Density Lipoprotein Receptor and Serum Cholesterol Levels », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 52, p. 43482-43491, déc. 2012.
- [124] S. Benjannet, D. Rhainds, J. Hamelin, N. Nassoury, et N. G. Seidah, « The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 41, p. 30561-30572, oct. 2006.
- [125] D. Fan, P. G. Yancey, S. Qiu, L. Ding, E. J. Weeber, M. F. Linton, et S. Fazio, « Self-Association of Human PCSK9 Correlates with Its LDLR-Degrading Activity[†] », *Biochemistry*, vol. 47, n° 6, p. 1631-1639, févr. 2008.
- [126] A. Grefhorst, M. C. McNutt, T. A. Lagace, et J. D. Horton, « Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice », *J. Lipid Res.*, vol. 49, n° 6, p. 1303-1311, juin 2008.
- [127] S. G. Lakoski, T. A. Lagace, J. C. Cohen, J. D. Horton, et H. H. Hobbs, « Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 94, n° 7, p. 2537-2543, juill. 2009.
- [128] W. E. Alborn, G. Cao, H. E. Careskey, Y.-W. Qian, D. R. Subramaniam, J. Davies, E. M. Conner, et R. J. Konrad, « Serum Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Is Correlated Directly with Serum LDL Cholesterol », *Clinical Chemistry*, vol. 53, n° 10, p. 1814-1819, oct. 2007.
- [129] J. Mayne, A. Raymond, A. Chaplin, M. Cousins, N. Kaefer, C. Gyamera-Acheampong, N. G. Seidah, M. Mbikay, M. Chrétien, et T. C. Ooi, « Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 361, n° 2, p. 451-456, sept. 2007.

- [130] M. L. Bras, A. Roquilly, V. Deckert, C. Langhi, F. Feuillet, V. Sébille, P.-J. Mahé, K. Bach, D. Masson, L. Lagrost, P. Costet, K. Asehounne, et B. Cariou, « Plasma PCSK9 Is a Late Biomarker of Severity in Patients With Severe Trauma Injury », *JCEM*, févr. 2013.
- [131] H. J. Kwon, T. A. Lagace, M. C. McNutt, J. D. Horton, et J. Deisenhofer, « Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, n° 6, p. 1820-1825, févr. 2008.
- [132] K. N. Maxwell, E. A. Fisher, et J. L. Breslow, « Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 102, n° 6, p. 2069-2074, févr. 2005.
- [133] M. C. McNutt, T. A. Lagace, et J. D. Horton, « Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n° 29, p. 20799-20803, juill. 2007.
- [134] S. Rashid, D. E. Curtis, R. Garuti, N. N. Anderson, Y. Bashmakov, Y. K. Ho, R. E. Hammer, Y.-A. Moon, et J. D. Horton, « Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 102, n° 15, p. 5374-5379, avr. 2005.
- [135] D. Steinberg et J. L. Witztum, « Inhibition of PCSK9: a powerful weapon for achieving ideal LDL cholesterol levels », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 106, n° 24, p. 9546-9547, juin 2009.
- [136] S. Pandit, D. Wisniewski, J. C. Santoro, S. Ha, V. Ramakrishnan, R. M. Cubbon, R. T. Cummings, S. D. Wright, C. P. Sparrow, A. Sitlani, et T. S. Fisher, « Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia », *J. Lipid Res.*, vol. 49, n° 6, p. 1333-1343, juin 2008.
- [137] H. J. Jeong, H.-S. Lee, K.-S. Kim, Y.-K. Kim, D. Yoon, et S. W. Park, « Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2 », *J. Lipid Res.*, vol. 49, n° 2, p. 399-409, févr. 2008.
- [138] M. Wu, B. Dong, A. Cao, H. Li, et J. Liu, « Delineation of molecular pathways that regulate hepatic PCSK9 and LDL receptor expression during fasting in normolipidemic hamsters », *Atherosclerosis*, vol. 224, n° 2, p. 401-410, oct. 2012.
- [139] J. D. Browning et J. D. Horton, « Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans », *J. Lipid Res.*, vol. 51, n° 11, p. 3359-3363, nov. 2010.
- [140] L. Persson, G. Cao, L. Ståhle, B. G. Sjöberg, J. S. Troutt, R. J. Konrad, C. Gälman, H. Wallén, M. Eriksson, I. Hafström, S. Lind, M. Dahlin, P. Åmark, B. Angelin, et M. Rudling, « Circulating Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Has a Diurnal Rhythm Synchronous With Cholesterol Synthesis and Is Reduced by Fasting in Humans », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 30, n° 12, p. 2666-2672, janv. 2010.
- [141] P. Costet, B. Cariou, G. Lambert, F. Lalanne, B. Lardeux, A.-L. Jarnoux, A. Grefhorst, B. Staels, et M. Krempf, « Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 10, p. 6211-6218, mars 2006.
- [142] D. Ai, C. Chen, S. Han, A. Ganda, A. J. Murphy, R. Haeusler, E. Thorp, D. Accili, J. D. Horton, et A. R. Tall, « Regulation of hepatic LDL receptors by mTORC1 and PCSK9 in mice », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, n° 4, p. 1262-1270, avr. 2012.
- [143] R. Tao, X. Xiong, R. A. DePinho, C.-X. Deng, et X. C. Dong, « FoxO3 transcription factor and Sirt6 deacetylase regulate LDL-cholesterol homeostasis via control of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (Pcsk9) gene expression », *J. Biol. Chem.*, août 2013.
- [144] B. Cariou, C. Langhi, M. Le Bras, M. Bortolotti, K.-A. Lê, F. Theytaz, C. Le May, B. Guyomarc H-Delasalle, Y. Zaïr, R. Kreis, C. Boesch, M. Krempf, L. Tappy, et P. Costet, « Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets », *Nutr Metab (Lond)*, vol. 10, n° 1, p. 4, janv. 2013.
- [145] L. Persson, C. Gälman, B. Angelin, et M. Rudling, « Importance of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 in the Hormonal and Dietary Regulation of Rat Liver Low-Density Lipoprotein Receptors », *Endocrinology*, vol. 150, n° 3, p. 1140-1146, janv. 2009.
- [146] K. N. Maxwell, R. E. Soccio, E. M. Duncan, E. Sehayek, et J. L. Breslow, « Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice », *J. Lipid Res.*, vol. 44, n° 11, p. 2109-2119, nov. 2003.
- [147] L. Persson, P. Henriksson, E. Westerlund, O. Hovatta, B. Angelin, et M. Rudling, « Endogenous estrogens lower plasma PCSK9 and LDL cholesterol but not Lp(a) or bile acid synthesis in women », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, n° 3, p. 810-814, mars 2012.
- [148] G. Dubuc, A. Chamberland, H. Wassef, J. Davignon, N. G. Seidah, L. Bernier, et A. Prat, « Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1

- implicated in familial hypercholesterolemia », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, n° 8, p. 1454-1459, août 2004.
- [149] H. K. Berthold, N. G. Seidah, S. Benjannet, et I. Gouni-Berthold, « Evidence from a Randomized Trial That Simvastatin, but Not Ezetimibe, Upregulates Circulating PCSK9 Levels », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 3, p. e60095, mars 2013.
- [150] J. Cameron, T. Ranheim, M. A. Kulseth, T. P. Leren, et K. E. Berge, « Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells », *Atherosclerosis*, vol. 201, n° 2, p. 266-273, déc. 2008.
- [151] A. Cao, M. Wu, H. Li, et J. Liu, « Janus kinase activation by cytokine oncostatin M decreases PCSK9 expression in liver cells », *J. Lipid Res.*, vol. 52, n° 3, p. 518-530, mars 2011.
- [152] A. Armendariz et R. Krauss, « Hepatic nuclear factor 1- α : inflammation, genetics, and atherosclerosis », *Current Opinion in Lipidology April 2009*, vol. 20, n° 2, p. 106-111, 2009.
- [153] B. Dong, M. Wu, H. Li, F. B. Kraemer, K. Adeli, N. G. Seidah, S. W. Park, et J. Liu, « Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1 α and SREBP2: mechanism for the resistance to LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters », *J. Lipid Res.*, vol. 51, n° 6, p. 1486-1495, juin 2010.
- [154] H. Li, B. Dong, S. W. Park, H.-S. Lee, W. Chen, et J. Liu, « Hepatocyte Nuclear Factor 1 α Plays a Critical Role in PCSK9 Gene Transcription and Regulation by the Natural Hypocholesterolemic Compound Berberine », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 42, p. 28885-28895, oct. 2009.
- [155] S. Kourimate, C. Le May, C. Langhi, A. L. Jarnoux, K. Ouguerram, Y. Zaïr, P. Nguyen, M. Krempf, B. Cariou, et P. Costet, « Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 15, p. 9666-9673, avr. 2008.
- [156] G. Lambert, A.-L. Jarnoux, T. Pineau, O. Pape, M. Chetiveaux, C. Laboisie, M. Krempf, et P. Costet, « Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor », *Endocrinology*, vol. 147, n° 10, p. 4985-4995, oct. 2006.
- [157] P. Costet, M. M. Hoffmann, B. Cariou, B. Guyomarc'h Delasalle, T. Konrad, et K. Winkler, « Plasma PCSK9 is increased by fenofibrate and atorvastatin in a non-additive fashion in diabetic patients », *Atherosclerosis*, vol. 212, n° 1, p. 246-251, sept. 2010.
- [158] Y. Duan, Y. Chen, W. Hu, X. Li, X. Yang, X. Zhou, Z. Yin, D. Kong, Z. Yao, D. P. Hajjar, L. Liu, Q. Liu, et J. Han, « Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activation by Ligands and Dephosphorylation Induces Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 and Low Density Lipoprotein Receptor Expression », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 28, p. 23667-23677, juin 2012.
- [159] C. Langhi, C. Le May, S. Kourimate, S. Caron, B. Staels, M. Krempf, P. Costet, et B. Cariou, « Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes », *FEBS Lett.*, vol. 582, n° 6, p. 949-955, mars 2008.
- [160] C. Le May, S. Kourimate, C. Langhi, M. Chétiveaux, A. Jarry, C. Comera, X. Collet, F. Kuipers, M. Krempf, B. Cariou, et P. Costet, « Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, n° 5, p. 684-690, mai 2009.
- [161] E. Levy, A. B. D. Ouadda, S. Spahis, A. T. Sane, C. Garofalo, É. Grenier, L. Emonnot, S. Yara, P. Couture, J.-F. Beaulieu, D. Ménard, N. G. Seidah, et M. Elchebly, « PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells », *Atherosclerosis*.
- [162] R. J. Schmidt, T. P. Beyer, W. R. Benscher, Y.-W. Qian, A. Lin, M. Kowala, W. E. Alborn, R. J. Konrad, et G. Cao, « Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 370, n° 4, p. 634-640, juin 2008.
- [163] J. D. Horton, J. C. Cohen, et H. H. Hobbs, « Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 32, n° 2, p. 71-77, févr. 2007.
- [164] M. J. Graham, K. M. Lemonidis, C. P. Whipple, A. Subramaniam, B. P. Monia, S. T. Crooke, et R. M. Crooke, « Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice », *J. Lipid Res.*, vol. 48, n° 4, p. 763-767, janv. 2007.
- [165] N. Gupta, N. Fisker, M.-C. Asselin, M. Lindholm, C. Rosenbohm, H. Ørum, J. Elmén, N. G. Seidah, et E. M. Straarup, « A Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotide (LNA) Silences PCSK9 and Enhances LDLR Expression In Vitro and In Vivo », *PLoS ONE*, vol. 5, n° 5, p. e10682, mai 2010.
- [166] M. W. Lindholm, J. Elmén, N. Fisker, H. F. Hansen, R. Persson, M. R. Møller, C. Rosenbohm, H. Ørum, E. M. Straarup, et T. Koch, « PCSK9 LNA Antisense Oligonucleotides Induce Sustained Reduction of LDL Cholesterol in Nonhuman Primates », *Mol Ther.*, vol. 20, n° 2, p. 376-381, févr. 2012.

- [167] E. P. van Poelgeest, R. M. Swart, M. G. H. Betjes, M. Moerland, J. J. Weening, Y. Tessier, M. R. Hodges, A. A. Levin, et J. Burggraaf, « Acute Kidney Injury During Therapy With an Antisense Oligonucleotide Directed Against PCSK9 », *American Journal of Kidney Diseases*.
- [168] J. M. McKenney, M. J. Koren, D. J. Kereiakes, C. Hanotin, A.-C. Ferrand, et E. A. Stein, « Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 59, n° 25, p. 2344-2353, juin 2012.
- [169] E. A. Stein, D. Gipe, J. Bergeron, D. Gaudet, R. Weiss, R. Dufour, R. Wu, et R. Porchy, « Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial », *Lancet*, vol. 380, n° 9836, p. 29-36, juill. 2012.
- [170] E. M. Roth, J. M. McKenney, C. Hanotin, G. Asset, et E. A. Stein, « Atorvastatin with or without an Antibody to PCSK9 in Primary Hypercholesterolemia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, n° 20, p. 1891-1900, nov. 2012.
- [171] R. Huijgen, S. M. Boekholdt, B. J. Arsenault, W. Bao, J.-M. Davaine, F. Tabet, F. Petrides, K.-A. Rye, D. A. Demicco, P. J. Barter, J. J. P. Kastelein, et G. Lambert, « Plasma PCSK9 Levels and Clinical Outcomes in the TNT (Treating to New Targets) Trial: A Nested Case-Control Study », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 59, n° 20, p. 1778-1784, mai 2012.
- [172] R. P. Giugliano, N. R. Desai, P. Kohli, W. J. Rogers, R. Somaratne, F. Huang, T. Liu, S. Mohanavelu, E. B. Hoffman, S. T. McDonald, T. E. Abrahamsen, S. M. Wasserman, R. Scott, M. S. Sabatine, et LAPLACE-TIMI 57 Investigators, « Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in combination with a statin in patients with hypercholesterolaemia (LAPLACE-TIMI 57): a randomised, placebo-controlled, dose-ranging, phase 2 study », *Lancet*, vol. 380, n° 9858, p. 2007-2017, déc. 2012.
- [173] M. Denis, J. Marcinkiewicz, A. Zaid, D. Gauthier, S. Poirier, C. Lazure, N. G. Seidah, et A. Prat, « Gene Inactivation of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Reduces Atherosclerosis in Mice », *Circulation*, vol. 125, n° 7, p. 894-901, févr. 2012.
- [174] S. K. Moestrup, J. Gliemann, et G. Pallesen, « Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues », *Cell Tissue Res.*, vol. 269, n° 3, p. 375-382, sept. 1992.
- [175] U. Beisiegel, W. Weber, G. Ihrke, J. Herz, et K. K. Stanley, « The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein », *Nature*, vol. 341, n° 6238, p. 162-164, sept. 1989.
- [176] T. E. Willnow, S. A. Armstrong, R. E. Hammer, et J. Herz, « Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 92, n° 10, p. 4537-4541, mai 1995.
- [177] T. E. Willnow, Z. Sheng, S. Ishibashi, et J. Herz, « Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist », *Science*, vol. 264, n° 5164, p. 1471-1474, juin 1994.
- [178] J. H. Moon, S. B. Kang, J. S. Park, B. W. Lee, E. S. Kang, C. W. Ahn, H. C. Lee, et B. S. Cha, « Up-regulation of hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein 1: a possible novel mechanism of antiatherogenic activity of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor: Atorvastatin and hepatic LRP1 expression », *Metabolism*, vol. 60, n° 7, p. 930-940, juill. 2011.
- [179] S. Takahashi, Y. Kawarabayasi, T. Nakai, J. Sakai, et T. Yamamoto, « Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 89, n° 19, p. 9252-9256, oct. 1992.
- [180] S. S. Reddy, T. E. Connor, E. J. Weeber, et W. Rebeck, « Similarities and differences in structure, expression, and functions of VLDLR and ApoER2 », *Mol Neurodegener*, vol. 6, p. 30, 2011.
- [181] J. R. Goudriaan, S. M. S. Espirito Santo, P. J. Voshol, B. Teusink, K. W. van Dijk, B. J. M. van Vlijmen, J. A. Romijn, L. M. Havekes, et P. C. N. Rensen, « The VLDL receptor plays a major role in chylomicron metabolism by enhancing LPL-mediated triglyceride hydrolysis », *J. Lipid Res.*, vol. 45, n° 8, p. 1475-1481, août 2004.
- [182] G. Go et A. Mani, « Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Family Orchestrates Cholesterol Homeostasis », *The Yale Journal of Biology and Medicine*, vol. 85, n° 1, p. 19, mars 2012.
- [183] S. Stefansson, D. A. Chappell, K. M. Argraves, D. K. Strickland, et W. S. Argraves, « Glycoprotein 330/Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-2 Mediates Endocytosis of Low Density Lipoproteins via Interaction with Apolipoprotein B100 », *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n° 33, p. 19417-19421, août 1995.

- [184] A. Mii, T. Nakajima, Y. Fujita, Y. Iino, K. Kamimura, H. Bujo, Y. Saito, M. Emi, et Y. Katayama, « Genetic association of low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2) with plasma lipid levels », *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 14, n° 6, p. 310-316, déc. 2007.
- [185] J. Hsu et J. D. Smith, « Genome-wide studies of gene expression relevant to coronary artery disease », *Curr. Opin. Cardiol.*, vol. 27, n° 3, p. 210-213, mai 2012.
- [186] T. E. Willnow, M. Kjølby, et A. Nykjaer, « Sortilins: new players in lipoprotein metabolism », *Current Opinion in Lipidology*, vol. 22, n° 2, p. 79-85, avr. 2011.
- [187] M. S. Nielsen, P. Madsen, E. I. Christensen, A. Nykjaer, J. Gliemann, D. Kasper, R. Pohlmann, et C. M. Petersen, « The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein », *EMBO J.*, vol. 20, n° 9, p. 2180-2190, mai 2001.
- [188] K. Musunuru, A. Strong, M. Frank-Kamenetsky, N. E. Lee, T. Ahfeldt, K. V. Sachs, X. Li, H. Li, N. Kuperwasser, V. M. Ruda, J. P. Pirruccello, B. Muchmore, L. Prokunina-Olsson, J. L. Hall, E. E. Schadt, C. R. Morales, S. Lund-Katz, M. C. Phillips, J. Wong, W. Cantley, T. Racie, K. G. Ejebe, M. Orho-Melander, O. Melander, V. Koteliensky, K. Fitzgerald, R. M. Krauss, C. A. Cowan, S. Kathiresan, et D. J. Rader, « From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus », *Nature*, vol. 466, n° 7307, p. 714-719, août 2010.
- [189] A. Strong, Q. Ding, A. C. Edmondson, J. S. Millar, K. V. Sachs, X. Li, A. Kumaravel, M. Y. Wang, D. Ai, L. Guo, E. T. Alexander, D. Nguyen, S. Lund-Katz, M. C. Phillips, C. R. Morales, A. R. Tall, S. Kathiresan, E. A. Fisher, K. Musunuru, et D. J. Rader, « Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism », *J. Clin. Invest.*, vol. 122, n° 8, p. 2807-2816, août 2012.
- [190] S. Acton, A. Rigotti, K. T. Landschulz, S. Xu, H. H. Hobbs, et M. Krieger, « Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor », *Science*, vol. 271, n° 5248, p. 518-520, janv. 1996.
- [191] V. A. Drover, M. Ajmal, F. Nassir, N. O. Davidson, A. M. Nauli, D. Sahoo, P. Tso, et N. A. Abumrad, « CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood », *J. Clin. Invest.*, vol. 115, n° 5, p. 1290-1297, mai 2005.
- [192] D. Calvo, D. Gómez-Coronado, Y. Suárez, M. A. Lasunción, et M. A. Vega, « Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL », *J. Lipid Res.*, vol. 39, n° 4, p. 777-788, janv. 1998.
- [193] P. A. Mak, B. A. Laffitte, C. Desrumaux, S. B. Joseph, L. K. Curtiss, D. J. Mangelsdorf, P. Tontonoz, et P. A. Edwards, « Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 35, p. 31900-31908, août 2002.
- [194] B. A. Laffitte, S. B. Joseph, M. Chen, A. Castrillo, J. Repa, D. Wilpitz, D. Mangelsdorf, et P. Tontonoz, « The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, n° 6, p. 2182-2191, mars 2003.
- [195] Y. Luo et A. R. Tall, « Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element », *J. Clin. Invest.*, vol. 105, n° 4, p. 513-520, févr. 2000.
- [196] Y. Zhang, J. J. Repa, K. Gauthier, et D. J. Mangelsdorf, « Regulation of Lipoprotein Lipase by the Oxysterol Receptors, LXR α and LXR β », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 46, p. 43018-43024, nov. 2001.
- [197] J. L. Goldstein et M. S. Brown, « The LDL Receptor », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 29, n° 4, p. 431-438, janv. 2009.
- [198] A. D. Sniderman, Y. Qi, C.-I. J. Ma, R. H. L. Wang, M. Naples, C. Baker, J. Zhang, K. Adeli, et R. S. Kiss, « Hepatic Cholesterol Homeostasis Is the Low-Density Lipoprotein Pathway a Regulatory or a Shunt Pathway? », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, p. ATVBAHA.113.301517, août 2013.
- [199] G. P. Hayhurst, Y.-H. Lee, G. Lambert, J. M. Ward, et F. J. Gonzalez, « Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (Nuclear Receptor 2A1) Is Essential for Maintenance of Hepatic Gene Expression and Lipid Homeostasis », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, n° 4, p. 1393-1403, févr. 2001.
- [200] P. Lefebvre, B. Cariou, F. Lien, F. Kuipers, et B. Staels, « Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation », *Physiol Rev*, vol. 89, n° 1, p. 147-191, janv. 2009.
- [201] P. Costet, « Molecular pathways and agents for lowering LDL-cholesterol in addition to statins », *Pharmacol. Ther.*, vol. 126, n° 3, p. 263-278, juin 2010.
- [202] M. J. Chapman, « Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease », *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 111, n° 3, p. 893-908, sept. 2006.
- [203] R. S. Rosenson, H. B. Brewer, W. S. Davidson, Z. A. Fayad, V. Fuster, J. Goldstein, M. Hellerstein, X.-C. Jiang, M. C. Phillips, D. J. Rader, A. T. Remaley, G. H. Rothblat, A. R. Tall, et L. Yvan-Charvet, « Cholesterol Efflux

and Atheroprotection Advancing the Concept of Reverse Cholesterol Transport », *Circulation*, vol. 125, n° 15, p. 1905-1919, avr. 2012.

[204] W. P. Castelli, R. J. Garrison, P. W. Wilson, R. D. Abbott, S. Kalousdian, et W. B. Kannel, « Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study », *JAMA*, vol. 256, n° 20, p. 2835-2838, nov. 1986.

[205] G. Walldius, I. Jungner, I. Holme, A. H. Aastveit, W. Kolar, et E. Steiner, « High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study », *Lancet*, vol. 358, n° 9298, p. 2026-2033, déc. 2001.

[206] E. M. deGoma et D. J. Rader, « Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies », *Nat Rev Cardiol*, vol. 8, n° 5, p. 266-277, mai 2011.

[207] D. C. Schwenke et T. E. Carew, « Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions », *Arteriosclerosis*, vol. 9, n° 6, p. 895-907, déc. 1989.

[208] D. C. Schwenke et T. E. Carew, « Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries », *Arteriosclerosis*, vol. 9, n° 6, p. 908-918, déc. 1989.

[209] D. Steinberg, S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo, et J. L. Witztum, « Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity », *N. Engl. J. Med.*, vol. 320, n° 14, p. 915-924, avr. 1989.

[210] P. E. Fielding, M. Kawano, A. L. Catapano, A. Zoppo, S. Marcovina, et C. J. Fielding, « Unique epitope of apolipoprotein A-I expressed in pre-beta-1 high-density lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol », *Biochemistry*, vol. 33, n° 22, p. 6981-6985, juin 1994.

[211] L. Lagrost, C. Desrumaux, D. Masson, V. Deckert, et P. Gambert, « Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein », *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 9, n° 3, p. 203-209, juin 1998.

[212] M. R. Hayden, S. M. Clee, A. Brooks-Wilson, J. Genest Jr, A. Attie, et J. J. Kastelein, « Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency », *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 11, n° 2, p. 117-122, avr. 2000.

[213] C. Vergani et G. Bettale, « Familial hypo-alpha-lipoproteinemia », *Clinica Chimica Acta*, vol. 114, n° 1, p. 45-52, juill. 1981.

[214] J. F. Oram et A. M. Vaughan, « ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease », *Circ. Res.*, vol. 99, n° 10, p. 1031-1043, nov. 2006.

[215] X. Wang, H. L. Collins, M. Ranalletta, I. V. Fuki, J. T. Billheimer, G. H. Rothblat, A. R. Tall, et D. J. Rader, « Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo », *J. Clin. Invest.*, vol. 117, n° 8, p. 2216-2224, août 2007.

[216] M.-D. Wang, V. Franklin, et Y. L. Marcel, « In Vivo Reverse Cholesterol Transport From Macrophages Lacking ABCA1 Expression Is Impaired », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 27, n° 8, p. 1837-1842, janv. 2007.

[217] M. Haghpassand, P. A. Bourassa, O. L. Francone, et R. J. Aiello, « Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels », *J. Clin. Invest.*, vol. 108, n° 9, p. 1315-1320, nov. 2001.

[218] I. C. Gelissen, M. Harris, K.-A. Rye, C. Quinn, A. J. Brown, M. Kockx, S. Cartland, M. Packianathan, L. Kritharides, et W. Jessup, « ABCA1 and ABCG1 Synergize to Mediate Cholesterol Export to ApoA-I », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 26, n° 3, p. 534-540, janv. 2006.

[219] J. Klucken, C. Büchler, E. Orsó, W. E. Kaminski, M. Porsch-Ozcürümez, G. Liebisch, M. Kapinsky, W. Diederich, W. Drobnik, M. Dean, R. Allikmets, et G. Schmitz, « ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 97, n° 2, p. 817-822, janv. 2000.

[220] M. A. Kennedy, G. C. Barrera, K. Nakamura, Á. Baldán, P. Tarr, M. C. Fishbein, J. Frank, O. L. Francone, et P. A. Edwards, « ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation », *Cell Metabolism*, vol. 1, n° 2, p. 121-131, févr. 2005.

[221] R. Out, W. Jessup, W. L. Goff, M. Hoekstra, I. C. Gelissen, Y. Zhao, L. Kritharides, G. Chimini, J. Kuiper, M. J. Chapman, T. Huby, T. J. C. V. Berkel, et M. V. Eck, « Coexistence of Foam Cells and Hypocholesterolemia in Mice Lacking the ABC Transporters A1 and G1 », *Circulation Research*, vol. 102, n° 1, p. 113-120, avr. 2008.

[222] Y. Ji, B. Jian, N. Wang, Y. Sun, M. de la L. Moya, M. C. Phillips, G. H. Rothblat, J. B. Swaney, et A. R. Tall, « Scavenger Receptor BI Promotes High Density Lipoprotein-mediated Cellular Cholesterol Efflux », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 34, p. 20982-20985, août 1997.

- [223] M. Krieger, « Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems », *J. Clin. Invest.*, vol. 108, n° 6, p. 793-797, sept. 2001.
- [224] Z. H. Huang, D. Gu, Y. Lange, et T. Mazzone, « Expression of Scavenger Receptor BI Facilitates Sterol Movement between the Plasma Membrane and the Endoplasmic Reticulum in Macrophages† », *Biochemistry*, vol. 42, n° 13, p. 3949-3955, avr. 2003.
- [225] Y. Zhao, M. Pennings, C. L. J. Vriens, L. Calpe-Berdiel, M. Hoekstra, J. K. Kruijt, R. Ottenhoff, R. B. Hildebrand, R. van der Sluis, W. Jessup, W. Le Goff, M. J. Chapman, T. Huby, A. K. Groen, T. J. C. Van Berkel, et M. Van Eck, « Hypocholesterolemia, foam cell accumulation, but no atherosclerosis in mice lacking ABC-transporter A1 and scavenger receptor BI », *Atherosclerosis*, vol. 218, n° 2, p. 314-322, oct. 2011.
- [226] C. Langer, Y. Huang, P. Cullen, B. Wiesenhütter, R. W. Mahley, G. Assmann, et A. von Eckardstein, « Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages », *J. Mol. Med.*, vol. 78, n° 4, p. 217-227, 2000.
- [227] I. Zanotti, M. Pedrelli, F. Potì, G. Stomeo, M. Gomaschi, L. Calabresi, et F. Bernini, « Macrophage, But Not Systemic, Apolipoprotein E Is Necessary for Macrophage Reverse Cholesterol Transport In Vivo », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 31, n° 1, p. 74-80, janv. 2011.
- [228] C. Cavelier, P. M. Ohnsorg, L. Rohrer, et A. von Eckardstein, « The β -Chain of Cell Surface F0F1 ATPase Modulates ApoA-I and HDL Transcytosis Through Aortic Endothelial Cells », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 32, n° 1, p. 131-139, janv. 2012.
- [229] C. Cavelier, L. Rohrer, et A. von Eckardstein, « ATP-Binding Cassette Transporter A1 Modulates Apolipoprotein A-I Transcytosis Through Aortic Endothelial Cells », *Circulation Research*, vol. 99, n° 10, p. 1060-1066, oct. 2006.
- [230] L. Rohrer, P. M. Ohnsorg, M. Lehner, F. Landolt, F. Rinninger, et A. von Eckardstein, « High-Density Lipoprotein Transport Through Aortic Endothelial Cells Involves Scavenger Receptor BI and ATP-Binding Cassette Transporter G1 », *Circulation Research*, vol. 104, n° 10, p. 1142-1150, mai 2009.
- [231] M. N. Nanjee, C. J. Cooke, J. S. Wong, R. L. Hamilton, W. L. Olszewski, et N. E. Miller, « Composition and ultrastructure of size subclasses of normal human peripheral lymph lipoproteins: quantification of cholesterol uptake by HDL in tissue fluids », *J. Lipid Res.*, vol. 42, n° 4, p. 639-648, janv. 2001.
- [232] L. O. Martinez, S. Jacquet, J.-P. Esteve, C. Rolland, E. Cabezon, E. Champagne, T. Pineau, V. Georgeaud, J. E. Walker, F. Tercé, X. Collet, B. Perret, et R. Barbaras, « Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis », *Nature*, vol. 421, n° 6918, p. 75-79, janv. 2003.
- [233] C. J. Cooke, M. N. Nanjee, I. P. Stepanova, W. L. Olszewski, et N. E. Miller, « Variations in lipid and apolipoprotein concentrations in human leg lymph: effects of posture and physical exercise », *Atherosclerosis*, vol. 173, n° 1, p. 39-45, mars 2004.
- [234] D. Reichl, « Lipoproteins of human peripheral lymph », *Eur. Heart J.*, vol. 11 Suppl E, p. 230-236, août 1990.
- [235] H. Y. Lim, C. H. Thiam, K. P. Yeo, R. Bisoesndial, C. S. Hii, K. C. Y. McGrath, K. W. Tan, A. Heather, J. S. J. Alexander, et V. Angeli, « Lymphatic Vessels Are Essential for the Removal of Cholesterol from Peripheral Tissues by SR-BI-Mediated Transport of HDL », *Cell Metabolism*, vol. 17, n° 5, p. 671-684, mai 2013.
- [236] J. B. Dixon, « Lymphatic lipid transport: sewer or subway? », *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 21, n° 8, p. 480-487, août 2010.
- [237] C. Martel, W. Li, B. Fulp, A. M. Platt, E. L. Gautier, M. Westerterp, R. Bittman, A. R. Tall, S.-H. Chen, M. J. Thomas, D. Kreisel, M. A. Swartz, M. G. Sorci-Thomas, et G. J. Randolph, « Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice », *Journal of Clinical Investigation*, mars 2013.
- [238] H. Y. Lim, J. M. Rutkowski, J. Helft, S. T. Reddy, M. A. Swartz, G. J. Randolph, et V. Angeli, « Hypercholesterolemic Mice Exhibit Lymphatic Vessel Dysfunction and Degeneration », *The American Journal of Pathology*, vol. 175, n° 3, p. 1328-1337, sept. 2009.
- [239] R. Williamson, D. Lee, J. Hagaman, et N. Maeda, « Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I », *PNAS*, vol. 89, n° 15, p. 7134-7138, janv. 1992.
- [240] Y. Zhang, I. Zanotti, M. P. Reilly, J. M. Glick, G. H. Rothblat, et D. J. Rader, « Overexpression of Apolipoprotein A-I Promotes Reverse Transport of Cholesterol From Macrophages to Feces In Vivo », *Circulation*, vol. 108, n° 6, p. 661-663, déc. 2003.

- [241] M. J. A. Amar, W. D'Souza, S. Turner, S. Demosky, D. Sviridov, J. Stonik, J. Luchoomun, J. Voogt, M. Hellerstein, D. Sviridov, et A. T. Remaley, « 5A Apolipoprotein Mimetic Peptide Promotes Cholesterol Efflux and Reduces Atherosclerosis in Mice », *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 334, n° 2, p. 634-641, janv. 2010.
- [242] J. K. Bielicki, H. Zhang, Y. Cortez, Y. Zheng, V. Narayanaswami, A. Patel, J. Johansson, et S. Azhar, « A new HDL mimetic peptide that stimulates cellular cholesterol efflux with high efficiency greatly reduces atherosclerosis in mice », *J. Lipid Res.*, vol. 51, n° 6, p. 1496-1503, juin 2010.
- [243] W. Annema et U. J. F. Tietge, « Role of Hepatic Lipase and Endothelial Lipase in High-Density Lipoprotein—Mediated Reverse Cholesterol Transport », *Curr Atheroscler Rep*, vol. 13, n° 3, p. 257-265, juin 2011.
- [244] T. Yasuda, T. Ishida, et D. J. Rader, « Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis », *Circ. J.*, vol. 74, n° 11, p. 2263-2270, nov. 2010.
- [245] M. Jaye, K. J. Lynch, J. Krawiec, D. Marchadier, C. Maugeais, K. Doan, V. South, D. Amin, M. Perrone, et D. J. Rader, « A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism », *Nat. Genet.*, vol. 21, n° 4, p. 424-428, avr. 1999.
- [246] R. J. Brown, W. R. Lagor, S. Sankaranarayanan, T. Yasuda, T. Quertermous, G. H. Rothblat, et D. J. Rader, « Impact of Combined Deficiency of Hepatic Lipase and Endothelial Lipase on the Metabolism of Both High-Density Lipoproteins and Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins », *Circulation Research*, vol. 107, n° 3, p. 357-364, juin 2010.
- [247] X. Collet, A. R. Tall, H. Serajuddin, K. Guendouzi, L. Royer, H. Oliveira, R. Barbaras, X. Jiang, et O. L. Francone, « Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavenger receptor B-I », *J. Lipid Res.*, vol. 40, n° 7, p. 1185-1193, janv. 1999.
- [248] K. Ma, M. Cilingiroglu, J. D. Otvos, C. M. Ballantyne, A. J. Marian, et L. Chan, « Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism », *PNAS*, vol. 100, n° 5, p. 2748-2753, avr. 2003.
- [249] C. J. Fielding, V. G. Shore, et P. E. Fielding, « A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 46, n° 4, p. 1493-1498, févr. 1972.
- [250] A. Jonas, « Lecithin cholesterol acyltransferase », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1529, n° 1-3, p. 245-256, déc. 2000.
- [251] H. Tanigawa, J. T. Billheimer, J. Tohyama, I. V. Fuki, D. S. Ng, G. H. Rothblat, et D. J. Rader, « Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Expression Has Minimal Effects on Macrophage Reverse Cholesterol Transport In Vivo », *Circulation*, vol. 120, n° 2, p. 160-169, juill. 2009.
- [252] M. E. Brousseau, S. Santamarina-Fojo, B. L. Vaisman, D. Applebaum-Bowden, A. M. Bérard, G. D. Talley, H. B. Brewer Jr, et J. M. Hoeg, « Overexpression of human lecithin:cholesterol acyltransferase in cholesterol-fed rabbits: LDL metabolism and HDL metabolism are affected in a gene dose-dependent manner », *J. Lipid Res.*, vol. 38, n° 12, p. 2537-2547, déc. 1997.
- [253] E. T. Alexander, C. Vedhachalam, S. Sankaranarayanan, M. de la Llera-Moya, G. H. Rothblat, D. J. Rader, et M. C. Phillips, « Influence of Apolipoprotein A-I Domain Structure on Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Mice », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 31, n° 2, p. 320-327, janv. 2011.
- [254] T. Oka, T. Kujiraoka, M. Ito, T. Egashira, S. Takahashi, M. N. Nanjee, N. E. Miller, J. Metso, V. M. Olkkonen, C. Ehnholm, M. Jauhiainen, et H. Hattori, « Distribution of phospholipid transfer protein in human plasma: presence of two forms of phospholipid transfer protein, one catalytically active and the other inactive », *J. Lipid Res.*, vol. 41, n° 10, p. 1651-1657, janv. 2000.
- [255] D. Masson, X.-C. Jiang, L. Lagrost, et A. R. Tall, « The role of plasma lipid transfer proteins in lipoprotein metabolism and atherogenesis », *The Journal of Lipid Research*, vol. 50, n° Supplement, p. S201-S206, déc. 2008.
- [256] X. C. Jiang, C. Bruce, J. Mar, M. Lin, Y. Ji, O. L. Francone, et A. R. Tall, « Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels », *J. Clin. Invest.*, vol. 103, n° 6, p. 907-914, mars 1999.
- [257] S. Lusa, M. Jauhiainen, J. Metso, P. Somerharju, et C. Ehnholm, « The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion », *Biochem. J.*, vol. 313 (Pt 1), p. 275-282, janv. 1996.
- [258] J. Huuskonen, V. M. Olkkonen, M. Jauhiainen, et C. Ehnholm, « The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism », *Atherosclerosis*, vol. 155, n° 2, p. 269-281, avr. 2001.

- [259] H. Samyn, M. Moerland, T. van Gent, R. van Haperen, F. Grosveld, A. van Tol, et R. de Crom, « Elevation of systemic PLTP, but not macrophage-PLTP, impairs macrophage reverse cholesterol transport in transgenic mice », *Atherosclerosis*, vol. 204, n° 2, p. 429-434, juin 2009.
- [260] Y. Luo, L. Shelly, T. Sand, B. Reidich, G. Chang, M. MacDougall, M.-C. Peakman, et X.-C. Jiang, « Pharmacologic Inhibition of Phospholipid Transfer Protein Activity Reduces Apolipoprotein-B Secretion from Hepatocytes », *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 332, n° 3, p. 1100-1106, janv. 2010.
- [261] P. J. Barter et J. J. P. Kastelein, « Targeting Cholesteryl Ester Transfer Protein for the Prevention and Management of Cardiovascular Disease », *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 47, n° 3, p. 492-499, févr. 2006.
- [262] W. Annema et U. J. Tietge, « Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies », *Nutrition & Metabolism*, vol. 9, n° 1, p. 25, 2012.
- [263] H. Tanigawa, J. T. Billheimer, J. Tohyama, Y. Zhang, G. Rothblat, et D. J. Rader, « Expression of Cholesteryl Ester Transfer Protein in Mice Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport », *Circulation*, vol. 116, n° 11, p. 1267-1273, nov. 2007.
- [264] U. Tchoua, W. D'Souza, N. Mukhamedova, D. Blum, E. Niesor, J. Mizrahi, C. Maugeais, et D. Sviridov, « The effect of cholesteryl ester transfer protein overexpression and inhibition on reverse cholesterol transport », *Cardiovasc Res*, vol. 77, n° 4, p. 732-739, janv. 2008.
- [265] J. Castro-Perez, F. Briand, K. Gagen, S.-P. Wang, Y. Chen, D. G. McLaren, V. Shah, R. J. Vreeken, T. Hankemeier, T. Sulpice, T. P. Roddy, B. K. Hubbard, et D. G. Johns, « Anacetrapib promotes reverse cholesterol transport and bulk cholesterol excretion in Syrian golden hamsters », *J. Lipid Res.*, vol. 52, n° 11, p. 1965-1973, nov. 2011.
- [266] E. J. Niesor, C. Magg, N. Ogawa, H. Okamoto, E. von der Mark, H. Matile, G. Schmid, R. G. Clerc, E. Chaput, D. Blum-Kaelin, W. Huber, R. Thoma, P. Pflieger, M. Kakutani, D. Takahashi, G. Dernick, et C. Maugeais, « Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre- β -HDL formation and increases reverse cholesterol transport », *J. Lipid Res.*, vol. 51, n° 12, p. 3443-3454, déc. 2010.
- [267] F. Briand, Q. Thieblemont, A. André, K. Ouguerram, et T. Sulpice, « CETP inhibitor torcetrapib promotes reverse cholesterol transport in obese insulin-resistant CETP-ApoB100 transgenic mice », *Clin Transl Sci*, vol. 4, n° 6, p. 414-420, déc. 2011.
- [268] D. R. Jacobs Jr, I. L. Mebane, S. I. Bangdiwala, M. H. Criqui, et H. A. Tyroler, « High density lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in men and women: the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study », *Am. J. Epidemiol.*, vol. 131, n° 1, p. 32-47, janv. 1990.
- [269] G. K. Hovingh, E. de Groot, W. van der Steeg, S. M. Boekholdt, B. A. Hutten, J. A. Kuivenhoven, et J. J. P. Kastelein, « Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis », *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 16, n° 2, p. 139-145, avr. 2005.
- [270] L. A. Morehouse, E. D. Sugarman, P.-A. Bourassa, T. M. Sand, F. Zimetti, F. Gao, G. H. Rothblat, et A. J. Milici, « Inhibition of CETP activity by torcetrapib reduces susceptibility to diet-induced atherosclerosis in New Zealand White rabbits », *J. Lipid Res.*, vol. 48, n° 6, p. 1263-1272, janv. 2007.
- [271] P. J. Barter, M. Caulfield, M. Eriksson, S. M. Grundy, J. J. P. Kastelein, M. Komajda, J. Lopez-Sendon, L. Mosca, J.-C. Tardif, D. D. Waters, C. L. Shear, J. H. Revkin, K. A. Buhr, M. R. Fisher, A. R. Tall, et B. Brewer, « Effects of Torcetrapib in Patients at High Risk for Coronary Events », *New England Journal of Medicine*, vol. 357, n° 21, p. 2109-2122, 2007.
- [272] M. J. Forrest, D. Bloomfield, R. J. Briscoe, P. N. Brown, A.-M. Cumiskey, J. Ehrhart, J. C. Hershey, W. J. Keller, X. Ma, H. E. McPherson, E. Messina, L. B. Peterson, W. Sharif-Rodriguez, P. K. S. Siegl, P. J. Sinclair, C. P. Sparrow, A. S. Stevenson, S.-Y. Sun, C. Tsai, H. Vargas, M. Walker, S. H. West, V. White, et R. F. Woltmann, « Torcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone », *British Journal of Pharmacology*, vol. 154, n° 7, p. 1465-1473, 2008.
- [273] X. Hu, J. D. Dietz, C. Xia, D. R. Knight, W. T. Loging, A. H. Smith, H. Yuan, D. A. Perry, et J. Keiser, « Torcetrapib Induces Aldosterone and Cortisol Production by an Intracellular Calcium-Mediated Mechanism Independently of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition », *Endocrinology*, vol. 150, n° 5, p. 2211-2219, janv. 2009.
- [274] E. A. Stein, E. M. Roth, J. M. Rhyne, T. Burgess, D. Kallend, et J. G. Robinson, « Safety and tolerability of dalcetrapib (RO4607381/JTT-705): results from a 48-week trial », *Eur Heart J*, vol. 31, n° 4, p. 480-488, janv. 2010.

- [275] J. A. Kuivenhoven, G. J. de Grooth, H. Kawamura, A. H. Klerkx, F. Wilhelm, M. D. Trip, et J. J. P. Kastelein, « Effectiveness of Inhibition of Cholesteryl Ester Transfer Protein by JTT-705 in Combination With Pravastatin in Type II Dyslipidemia », *The American Journal of Cardiology*, vol. 95, n° 9, p. 1085-1088, mai 2005.
- [276] G. G. Schwartz, A. G. Olsson, M. Abt, C. M. Ballantyne, P. J. Barter, J. Brumm, B. R. Chaitman, I. M. Holme, D. Kallend, L. A. Leiter, E. Leitersdorf, J. J. V. McMurray, H. Mundl, S. J. Nicholls, P. K. Shah, J.-C. Tardif, et R. S. Wright, « Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome », *New England Journal of Medicine*, vol. 367, n° 22, p. 2089-2099, 2012.
- [277] R. Krishna, M. S. Anderson, A. J. Bergman, B. Jin, M. Fallon, J. Cote, K. Rosko, C. Chavez-Eng, R. Lutz, D. M. Bloomfield, M. Gutierrez, J. Doherty, F. Bieberdorf, J. Chodakewitz, K. M. Gottesdiener, et J. A. Wagner, « Effect of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor, anacetrapib, on lipoproteins in patients with dyslipidaemia and on 24-h ambulatory blood pressure in healthy individuals: two double-blind, randomised placebo-controlled phase I studies », *The Lancet*, vol. 370, n° 9603, p. 1907-1914, 8.
- [278] D. Bloomfield, G. L. Carlson, A. Sapre, D. Tribble, J. M. McKenney, T. W. Littlejohn III, C. M. Sisk, Y. Mitchel, et R. C. Pasternak, « Efficacy and safety of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor anacetrapib as monotherapy and coadministered with atorvastatin in dyslipidemic patients », *American Heart Journal*, vol. 157, n° 2, p. 352-360.e2, févr. 2009.
- [279] B. H. Nicholls SJ, « Effects of the cetp inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on hdl and ldl cholesterol: A randomized controlled trial », *JAMA*, vol. 306, n° 19, p. 2099-2109, nov. 2011.
- [280] G. Cao, C. K. Garcia, K. L. Wyne, R. A. Schultz, K. L. Parker, et H. H. Hobbs, « Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1 », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 52, p. 33068-33076, déc. 1997.
- [281] K. T. Landschulz, R. K. Pathak, A. Rigotti, M. Krieger, et H. H. Hobbs, « Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat », *J. Clin. Invest.*, vol. 98, n° 4, p. 984-995, août 1996.
- [282] K. F. Kozarsky, M. H. Donahee, A. Rigotti, S. N. Iqbal, E. R. Edelman, et M. Krieger, « Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels », *Nature*, vol. 387, n° 6631, p. 414-417, mai 1997.
- [283] Y. Ji, N. Wang, R. Ramakrishnan, E. Sehayek, D. Huszar, J. L. Breslow, et A. R. Tall, « Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 47, p. 33398-33402, nov. 1999.
- [284] N. Wang, T. Arai, Y. Ji, F. Rinninger, et A. R. Tall, « Liver-specific Overexpression of Scavenger Receptor BI Decreases Levels of Very Low Density Lipoprotein ApoB, Low Density Lipoprotein ApoB, and High Density Lipoprotein in Transgenic Mice », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 49, p. 32920-32926, avr. 1998.
- [285] Y. Zhang, J. R. Da Silva, M. Reilly, J. T. Billheimer, G. H. Rothblat, et D. J. Rader, « Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo », *J. Clin. Invest.*, vol. 115, n° 10, p. 2870-2874, oct. 2005.
- [286] A. Rigotti, B. L. Trigatti, M. Penman, H. Rayburn, J. Herz, et M. Krieger, « 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 », *PNAS*, vol. 94, n° 23, p. 12610-12615, nov. 1997.
- [287] M. Brundert, A. Ewert, J. Heeren, B. Behrendt, R. Ramakrishnan, H. Greten, M. Merkel, et F. Rinninger, « Scavenger Receptor Class B Type I Mediates the Selective Uptake of High-Density Lipoprotein-Associated Cholesteryl Ester by the Liver in Mice », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 25, n° 1, p. 143-148, janv. 2005.
- [288] A. Braun, B. L. Trigatti, M. J. Post, K. Sato, M. Simons, J. M. Edelberg, R. D. Rosenberg, M. Schrenzel, et M. Krieger, « Loss of SR-BI Expression Leads to the Early Onset of Occlusive Atherosclerotic Coronary Artery Disease, Spontaneous Myocardial Infarctions, Severe Cardiac Dysfunction, and Premature Death in Apolipoprotein E-Deficient Mice », *Circulation Research*, vol. 90, n° 3, p. 270-276, févr. 2002.
- [289] A. C. Fabre, C. Malaval, A. Ben Addi, C. Verdier, V. Pons, N. Serhan, L. Lichtenstein, G. Combes, T. Huby, F. Briand, X. Collet, N. Nijstad, U. J. F. Tietge, B. Robaye, B. Perret, J.-M. Boeynaems, et L. O. Martinez, « P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport », *Hepatology*, vol. 52, n° 4, p. 1477-1483, oct. 2010.
- [290] S. Jacquet, C. Malaval, L. O. Martinez, K. Sak, C. Rolland, C. Perez, M. Nauze, E. Champagne, F. Tercé, C. Gachet, B. Perret, X. Collet, J.-M. Boeynaems, et R. Barbaras, « The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, n° 21, p. 2508-2515, nov. 2005.

- [291] H. Wiersma, A. Gatti, N. Nijstad, F. Kuipers, et U. J. F. Tietge, « Hepatic SR-BI, not endothelial lipase, expression determines biliary cholesterol secretion in mice », *J. Lipid Res.*, vol. 50, n° 8, p. 1571-1580, août 2009.
- [292] M. C. Carey, « Homing-in on the origin of biliary steroids », *Gut*, vol. 41, n° 5, p. 721-722, nov. 1997.
- [293] C. Hillebrant, B. Nyberg, K. Einarsson, et M. Eriksson, « The effect of plasma low density lipoprotein apheresis on the hepatic secretion of biliary lipids in humans », *Gut*, vol. 41, n° 5, p. 700, nov. 1997.
- [294] M. M. Fisher et I. M. Yousef, « Sex differences in the bile acid composition of human bile: Studies in patients with and without gallstones », *Canadian Medical Association Journal*, vol. 109, n° 3, p. 190, août 1973.
- [295] S. Ishibashi, M. Schwarz, P. K. Frykman, J. Herz, et D. W. Russell, « Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation », *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n° 30, p. 18017-18023, juill. 1996.
- [296] P. B. Hylemon, H. Zhou, W. M. Pandak, S. Ren, G. Gil, et P. Dent, « Bile acids as regulatory molecules », *J. Lipid Res.*, vol. 50, n° 8, p. 1509-1520, août 2009.
- [297] G. A. Graf, L. Yu, W.-P. Li, R. Gerard, P. L. Tuma, J. C. Cohen, et H. H. Hobbs, « ABCG5 and ABCG8 Are Obligate Heterodimers for Protein Trafficking and Biliary Cholesterol Excretion », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 48, p. 48275-48282, nov. 2003.
- [298] L. Yu, R. E. Hammer, J. Li-Hawkins, K. Von Bergmann, D. Lutjohann, J. C. Cohen, et H. H. Hobbs, « Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, n° 25, p. 16237-16242, déc. 2002.
- [299] K. E. Berge, K. von Bergmann, D. Lutjohann, R. Guerra, S. M. Grundy, H. H. Hobbs, et J. C. Cohen, « Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8 », *J. Lipid Res.*, vol. 43, n° 3, p. 486-494, mars 2002.
- [300] H. Wiersma, A. Gatti, N. Nijstad, R. P. J. Oude Elferink, F. Kuipers, et U. J. F. Tietge, « Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice », *Hepatology*, vol. 50, n° 4, p. 1263-1272, oct. 2009.
- [301] C. Vrans, E. Vink, K. E. Vandenberghe, R. Frijters, J. Seppen, et A. K. Groen, « The sterol transporting heterodimer ABCG5/ABCG8 requires bile salts to mediate cholesterol efflux », *FEBS Letters*, vol. 581, n° 24, p. 4616-4620, oct. 2007.
- [302] J. J. M. Smit, A. H. Schinkel, R. P. J. O. Elferink, A. K. Groen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. A. M. Mol, R. Ottenhoff, N. M. T. van der Lugt, M. A. van Roon, M. A. van der Valk, G. J. A. Offerhaus, A. J. M. Berns, et P. Borst, « Homozygous disruption of the murine MDR2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease », *Cell*, vol. 75, n° 3, p. 451-462, nov. 1993.
- [303] C. Cicione, C. Degirolamo, et A. Moschetta, « Emerging role of fibroblast growth factors 15/19 and 21 as metabolic integrators in the liver », *Hepatology*, vol. 56, n° 6, p. 2404-2411, déc. 2012.
- [304] E. Sehayek et S. L. Hazen, « Cholesterol absorption from the intestine is a major determinant of reverse cholesterol transport from peripheral tissue macrophages », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, n° 7, p. 1296-1297, juill. 2008.
- [305] F. Briand, S. U. Naik, I. Fuki, J. S. Millar, C. Macphee, M. Walker, J. Billheimer, G. Rothblat, et D. J. Rader, « Both the peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist, GW0742, and ezetimibe promote reverse cholesterol transport in mice by reducing intestinal reabsorption of HDL-derived cholesterol », *Clin Transl Sci*, vol. 2, n° 2, p. 127-133, avr. 2009.
- [306] A. Venkateswaran, B. A. Laffitte, S. B. Joseph, P. A. Mak, D. C. Wilpitz, P. A. Edwards, et P. Tontonoz, « Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 97, n° 22, p. 12097-12102, oct. 2000.
- [307] J. J. Repa, S. D. Turley, J. A. Lobaccaro, J. Medina, L. Li, K. Lustig, B. Shan, R. A. Heyman, J. M. Dietschy, et D. J. Mangelsdorf, « Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers », *Science*, vol. 289, n° 5484, p. 1524-1529, sept. 2000.
- [308] E. J. Tarling et P. A. Edwards, « ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter », *PNAS*, vol. 108, n° 49, p. 19719-19724, juin 2011.
- [309] T. Yasuda, D. Grillot, J. T. Billheimer, F. Briand, P. Delerive, S. Huet, et D. J. Rader, « Tissue-Specific Liver X Receptor Activation Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport In Vivo », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 30, n° 4, p. 781-786, janv. 2010.
- [310] D. J. Peet, S. D. Turley, W. Ma, B. A. Janowski, J. M. Lobaccaro, R. E. Hammer, et D. J. Mangelsdorf, « Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha », *Cell*, vol. 93, n° 5, p. 693-704, mai 1998.

- [311] I. Zanotti, F. Poti, M. Pedrelli, E. Favari, E. Moleri, G. Franceschini, L. Calabresi, et F. Bernini, « The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential », *J. Lipid Res.*, vol. 49, n° 5, p. 954-960, janv. 2008.
- [312] S. U. Naik, X. Wang, J. S. D. Silva, M. Jaye, C. H. Macphee, M. P. Reilly, J. T. Billheimer, G. H. Rothblat, et D. J. Rader, « Pharmacological Activation of Liver X Receptors Promotes Reverse Cholesterol Transport In Vivo », *Circulation*, vol. 113, n° 1, p. 90-97, mars 2006.
- [313] G. Lo Sasso, S. Murzilli, L. Salvatore, I. D'Errico, M. Petruzzelli, P. Conca, Z.-Y. Jiang, L. Calabresi, P. Parini, et A. Moschetta, « Intestinal Specific LXR Activation Stimulates Reverse Cholesterol Transport and Protects from Atherosclerosis », *Cell Metabolism*, vol. 12, n° 2, p. 187-193, août 2010.
- [314] H. Uppal, Y. Zhai, A. Gangopadhyay, S. Khadem, S. Ren, J. A. Moser, et W. Xie, « Activation of liver X receptor sensitizes mice to gallbladder cholesterol crystallization », *Hepatology*, vol. 47, n° 4, p. 1331-1342, avr. 2008.
- [315] A. Grefhorst, B. M. Elzinga, P. J. Voshol, T. Plösch, T. Kok, V. W. Bloks, F. H. van der Sluijs, L. M. Havekes, J. A. Romijn, H. J. Verkade, et F. Kuipers, « Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 37, p. 34182-34190, sept. 2002.
- [316] M. Makishima, A. Y. Okamoto, J. J. Repa, H. Tu, R. M. Learned, A. Luk, M. V. Hull, K. D. Lustig, D. J. Mangelsdorf, et B. Shan, « Identification of a nuclear receptor for bile acids », *Science*, vol. 284, n° 5418, p. 1362-1365, mai 1999.
- [317] B. M. Forman, E. Goode, J. Chen, A. E. Oro, D. J. Bradley, T. Perlmann, D. J. Noonan, L. T. Burka, T. McMorris, W. W. Lamph, R. M. Evans, et C. Weinberger, « Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites », *Cell*, vol. 81, n° 5, p. 687-693, juin 1995.
- [318] Y. Zhang, L. Yin, J. Anderson, H. Ma, F. J. Gonzalez, T. M. Willson, et P. A. Edwards, « Identification of novel pathways that control farnesoid X receptor-mediated hypocholesterolemia », *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n° 5, p. 3035-3043, janv. 2010.
- [319] G. Lambert, M. J. A. Amar, G. Guo, H. B. Brewer, F. J. Gonzalez, et C. J. Sinal, « The Farnesoid X-receptor Is an Essential Regulator of Cholesterol Homeostasis », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 4, p. 2563-2570, janv. 2003.
- [320] M. Fuchs, B. Ivandic, O. Müller, C. Schalla, J. Scheibner, P. Bartsch, et E. F. Stange, « Biliary cholesterol hypersecretion in gallstone-susceptible mice is associated with hepatic up-regulation of the high-density lipoprotein receptor SRBI », *Hepatology*, vol. 33, n° 6, p. 1451-1459, juin 2001.
- [321] N. L. Urizar, D. H. Dowhan, et D. D. Moore, « The Farnesoid X-activated Receptor Mediates Bile Acid Activation of Phospholipid Transfer Protein Gene Expression », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 50, p. 39313-39317, déc. 2000.
- [322] A. Sirvent, A. J. M. Verhoeven, H. Jansen, V. Kosykh, R. J. Darteil, D. W. Hum, J.-C. Fruchart, et B. Staels, « Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression », *J. Lipid Res.*, vol. 45, n° 11, p. 2110-2115, janv. 2004.
- [323] E. A. Hanniman, G. Lambert, T. C. McCarthy, et C. J. Sinal, « Loss of functional farnesoid X receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice », *J. Lipid Res.*, vol. 46, n° 12, p. 2595-2604, déc. 2005.
- [324] Y. Zhang, X. Wang, C. Vales, F. Y. Lee, H. Lee, A. J. Lusis, et P. A. Edwards, « FXR deficiency causes reduced atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, n° 10, p. 2316-2321, oct. 2006.
- [325] G. L. Guo, S. Santamarina-Fojo, T. E. Akiyama, M. J. A. Amar, B. J. Paigen, B. Brewer Jr, et F. J. Gonzalez, « Effects of FXR in foam-cell formation and atherosclerosis development », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1761, n° 12, p. 1401-1409, déc. 2006.
- [326] A. Mencarelli, B. Renga, E. Distrutti, et S. Fiorucci, « Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 296, n° 2, p. H272-281, févr. 2009.
- [327] H. B. Hartman, S. J. Gardell, C. J. Petucci, S. Wang, J. A. Krueger, et M. J. Evans, « Activation of farnesoid X receptor prevents atherosclerotic lesion formation in LDLR^{-/-} and apoE^{-/-} mice », *J. Lipid Res.*, vol. 50, n° 6, p. 1090-1100, juin 2009.
- [328] S. Kersten, B. Desvergne, et W. Wahli, « Roles of PPARs in health and disease », *Nature*, vol. 405, n° 6785, p. 421-424, mai 2000.

- [329] K. S. Miyata, S. E. McCaw, S. L. Marcus, R. A. Rachubinski, et J. P. Capone, « The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo », *Gene*, vol. 148, n° 2, p. 327-330, oct. 1994.
- [330] B. Staels, A. van Tol, T. Andreu, et J. Auwerx, « Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue-selective manner in the rat. », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 12, n° 3, p. 286-294, janv. 1992.
- [331] L. Berthou, N. Duverger, F. Emmanuel, S. Langouët, J. Auwerx, A. Guillouzo, J. C. Fruchart, E. Rubin, P. Denèfle, B. Staels, et D. Branellec, « Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 97, n° 11, p. 2408-2416, juin 1996.
- [332] B. L. Knight, D. D. Patel, S. M. Humphreys, D. Wiggins, et G. F. Gibbons, « Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR α -dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice », *J. Lipid Res.*, vol. 44, n° 11, p. 2049-2058, janv. 2003.
- [333] G. Chinetti, S. Lestavel, V. Bocher, A. T. Remaley, B. Neve, I. P. Torra, E. Teissier, A. Minnich, M. Jaye, N. Duverger, H. B. Brewer, J. C. Fruchart, V. Clavey, et B. Staels, « PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway », *Nat. Med.*, vol. 7, n° 1, p. 53-58, janv. 2001.
- [334] S. Colin, O. Briand, V. Touche, K. Wouters, M. Baron, F. Pattou, R. Hanf, A. Tailleux, G. Chinetti, B. Staels, et S. Lestavel, « Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor- α increases high-density lipoprotein production », *Eur Heart J*, vol. 34, n° 32, p. 2566-2574, août 2013.
- [335] B. Staels, A. van Tol, G. Skretting, et J. Auwerx, « Lecithin:cholesterol acyltransferase gene expression is regulated in a tissue-selective manner by fibrates. », *J. Lipid Res.*, vol. 33, n° 5, p. 727-735, janv. 1992.
- [336] M. Bouly, D. Masson, B. Gross, X. Jiang, C. Fievet, G. Castro, A. R. Tall, J.-C. Fruchart, B. Staels, L. Lagrost, et G. Luc, « Induction of the Phospholipid Transfer Protein Gene Accounts for the High Density Lipoprotein Enlargement in Mice Treated with Fenofibrate », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 28, p. 25841-25847, juill. 2001.
- [337] C. C. van der Hoogt, W. de Haan, M. Westerterp, M. Hoekstra, G. M. Dallinga-Thie, J. A. Romijn, H. M. G. Princen, J. W. Jukema, L. M. Havekes, et P. C. N. Rensen, « Fenofibrate increases HDL-cholesterol by reducing cholesteryl ester transfer protein expression », *J. Lipid Res.*, vol. 48, n° 8, p. 1763-1771, janv. 2007.
- [338] K. Nakaya, J. Tohyama, S. U. Naik, H. Tanigawa, C. MacPhee, J. T. Billheimer, et D. J. Rader, « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Activation Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport Through a Liver X Receptor-Dependent Pathway », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 31, n° 6, p. 1276-1282, janv. 2011.
- [339] R. Silvennoinen, J. C. Escola-Gil, J. Julve, N. Rotllan, G. Llaverias, J. Metso, A. F. Valledor, J. He, L. Yu, M. Jauhiainen, F. Blanco-Vaca, P. T. Kovanen, et M. Lee-Rueckert, « Acute psychological stress accelerates reverse cholesterol transport via corticosterone-dependent inhibition of intestinal cholesterol absorption », *Circ. Res.*, vol. 111, n° 11, p. 1459-1469, nov. 2012.
- [340] J. A. Glomset, « The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction », *J. Lipid Res.*, vol. 9, n° 2, p. 155-167, mars 1968.
- [341] W. M. Sperry, « LIPID EXCRETION », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 71, n° 2, p. 351-378, janv. 1927.
- [342] D. Pertsemlidis, E. H. Kirchman, et E. H. Ahrens Jr, « Regulation of cholesterol metabolism in the dog. I. Effects of complete bile diversion and of cholesterol feeding on absorption, synthesis, accumulation, and excretion rates measured during life », *J. Clin. Invest.*, vol. 52, n° 9, p. 2353-2367, sept. 1973.
- [343] G. Brufau, A. K. Groen, et F. Kuipers, « Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, n° 8, p. 1726-1733, août 2011.
- [344] R. E. Temel, W. Tang, Y. Ma, L. L. Rudel, M. C. Willingham, Y. A. Ioannou, J. P. Davies, L.-M. Nilsson, et L. Yu, « Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe », *J. Clin. Invest.*, vol. 117, n° 7, p. 1968-1978, juill. 2007.
- [345] J. M. Brown, T. A. Bell 3rd, H. M. Alger, J. K. Sawyer, T. L. Smith, K. Kelley, R. Shah, M. D. Wilson, M. A. Davis, R. G. Lee, M. J. Graham, R. M. Croke, et L. L. Rudel, « Targeted depletion of hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 16, p. 10522-10534, avr. 2008.
- [346] S. H. CHENG et M. M. STANLEY, « Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction », *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 101, n° 2, p. 223-225, juin 1959.

- [347] W. J. Simmonds, A. F. Hofmann, et E. Theodor, « Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man », *J. Clin. Invest.*, vol. 46, n° 5, p. 874-890, mai 1967.
- [348] J. N. van der Veen, T. H. van Dijk, C. L. J. Vrans, H. van Meer, R. Havinga, K. Bijsterveld, U. J. F. Tietge, A. K. Groen, et F. Kuipers, « Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 29, p. 19211-19219, juill. 2009.
- [349] A. E. van der Velde, C. L. J. Vrans, K. van den Oever, I. Seemann, R. P. J. Oude Elferink, M. van Eck, F. Kuipers, et A. K. Groen, « Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice », *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 295, n° 1, p. G203-G208, juill. 2008.
- [350] C. L. J. Vrans, R. Ottenhoff, K. van den Oever, D. R. de Waart, J. K. Kruij, Y. Zhao, T. J. C. van Berkel, L. M. Havekes, J. M. Aerts, M. van Eck, P. C. N. Rensen, et A. K. Groen, « Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein », *J. Lipid Res.*, vol. 53, n° 10, p. 2017-2023, oct. 2012.
- [351] K. S. Bura, C. Lord, S. Marshall, A. McDaniel, G. Thomas, M. Warrier, J. Zhang, M. A. Davis, J. K. Sawyer, R. Shah, M. D. Wilson, A. Dikkers, U. J. F. Tietge, X. Collet, L. L. Rudel, R. E. Temel, et J. M. Brown, « Intestinal SR-BI Does Not Impact Cholesterol Absorption or Transintestinal Cholesterol Efflux (TICE) in Mice », *J. Lipid Res.*, avr. 2013.
- [352] E. F. Stange et J. M. Dietschy, « Cholesterol synthesis and low density lipoprotein uptake are regulated independently in rat small intestinal epithelium. », 1983. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC384334/>. [Consulté le: 04-janv-2013].
- [353] Y. Osono, L. A. Woollett, J. Herz, et J. M. Dietschy, « Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 95, n° 3, p. 1124-1132, mars 1995.
- [354] C. L. J. Vrans, A. E. van der Velde, K. van den Oever, J. H. M. Levels, S. Huet, R. P. J. Oude Elferink, F. Kuipers, et A. K. Groen, « Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux », *J. Lipid Res.*, vol. 50, n° 10, p. 2046-2054, oct. 2009.
- [355] M. D. Linder, R.-L. Uronen, M. Hölttä-Vuori, P. van der Sluijs, J. Peränen, et E. Ikonen, « Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells », *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, n° 1, p. 47-56, janv. 2007.
- [356] K. Narita, A. Choudhury, K. Dobrenis, D. K. Sharma, E. L. Holicky, D. L. Marks, S. U. Walkley, et R. E. Pagano, « Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage », *FASEB J.*, vol. 19, n° 11, p. 1558-1560, sept. 2005.
- [357] A. Choudhury, M. Dominguez, V. Puri, D. K. Sharma, K. Narita, C. L. Wheatley, D. L. Marks, et R. E. Pagano, « Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells », *J. Clin. Invest.*, vol. 109, n° 12, p. 1541-1550, juin 2002.
- [358] E.-L. Eskelinen, Y. Tanaka, et P. Saftig, « At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins », *Trends Cell Biol.*, vol. 13, n° 3, p. 137-145, mars 2003.
- [359] R. G. Lee, M. C. Willingham, M. A. Davis, K. A. Skinner, et L. L. Rudel, « Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates », *J. Lipid Res.*, vol. 41, n° 12, p. 1991-2001, déc. 2000.
- [360] P. Parini, M. Davis, A. T. Lada, S. K. Erickson, T. L. Wright, U. Gustafsson, S. Sahlin, C. Einarsson, M. Eriksson, B. Angelin, H. Tomoda, S. Omura, M. C. Willingham, et L. L. Rudel, « ACAT2 is localized to hepatocytes and is the major cholesterol-esterifying enzyme in human liver », *Circulation*, vol. 110, n° 14, p. 2017-2023, oct. 2004.
- [361] R. G. Lee, R. Shah, J. K. Sawyer, R. L. Hamilton, J. S. Parks, et L. L. Rudel, « ACAT2 contributes cholesteryl esters to newly secreted VLDL, whereas LCAT adds cholesteryl ester to LDL in mice », *J. Lipid Res.*, vol. 46, n° 6, p. 1205-1212, juin 2005.
- [362] R. E. Temel et J. M. Brown, « Biliary and nonbiliary contributions to reverse cholesterol transport », *Current Opinion in Lipidology*, janv. 2012.
- [363] L. Jakulj, M. N. Vissers, C. P. van Roomen, J. N. van der Veen, C. L. J. Vrans, C. Kunne, F. Stellaard, J. J. P. Kastelein, et A. K. Groen, « Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice », *FEBS Letters*, vol. 584, n° 16, p. 3625-3628, août 2010.
- [364] J. J. Repa, K. E. Berge, C. Pomajzl, J. A. Richardson, H. Hobbs, et D. J. Mangelsdorf, « Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 21, p. 18793-18800, mai 2002.

- [365] E. M. Danielsen, G. H. Hansen, K. Rasmussen, L.-L. Niels-Christiansen, et F. Frenzel, « Apolipoprotein A-1 (apoA-1) deposition in, and release from, the enterocyte brush border: a possible role in transintestinal cholesterol efflux (TICE)? », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1818, n° 3, p. 530-536, mars 2012.
- [366] M. Sokolović, A. Sokolović, C. P. A. A. van Roomen, A. Gruber, R. Ottenhoff, S. Scheij, T. B. M. Hakvoort, W. H. Lamers, et A. K. Groen, « Unexpected effects of fasting on murine lipid homeostasis--transcriptomic and lipid profiling », *J. Hepatol.*, vol. 52, n° 5, p. 737-744, mai 2010.
- [367] G. Brufau, F. Kuipers, Y. Lin, E. A. Trautwein, et A. K. Groen, « A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 6, p. e21576, 2011.
- [368] W. R. Oliver, J. L. Shenk, M. R. Snaith, C. S. Russell, K. D. Plunket, N. L. Bodkin, M. C. Lewis, D. A. Winegar, M. L. Sznajdman, M. H. Lambert, H. E. Xu, D. D. Sternbach, S. A. Kliewer, B. C. Hansen, et T. M. Willson, « A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport », *PNAS*, vol. 98, n° 9, p. 5306-5311, avr. 2001.
- [369] H. E. Xu, M. H. Lambert, V. G. Montana, D. J. Parks, S. G. Blanchard, P. J. Brown, D. D. Sternbach, J. M. Lehmann, G. B. Wisely, T. M. Willson, S. A. Kliewer, et M. V. Milburn, « Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors », *Mol. Cell*, vol. 3, n° 3, p. 397-403, mars 1999.
- [370] J. A. Glomset et K. R. Norum, « The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology », *Adv. Lipid Res.*, vol. 11, p. 1-65, 1973.
- [371] N. Nijstad, T. Gautier, F. Briand, D. J. Rader, et U. J. F. Tietge, « Biliary sterol secretion is required for functional in vivo reverse cholesterol transport in mice », *Gastroenterology*, vol. 140, n° 3, p. 1043-1051, mars 2011.
- [372] R. E. Temel, J. K. Sawyer, L. Yu, C. Lord, C. Degirolamo, A. McDaniel, S. Marshall, N. Wang, R. Shah, L. L. Rudel, et J. M. Brown, « Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport », *Cell Metab.*, vol. 12, n° 1, p. 96-102, juill. 2010.
- [373] P. Xie, L. Jia, Y. Ma, J. Ou, H. Miao, N. Wang, F. Guo, A. Yazdanyar, X.-C. Jiang, et L. Yu, « Ezetimibe inhibits hepatic niemann-pick c1-like 1 to facilitate macrophage reverse cholesterol transport in mice », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, n° 5, p. 920-925, mai 2013.
- [374] R. M. Glickman et P. H. Green, « The intestine as a source of apolipoprotein A1 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 74, n° 6, p. 2569-2573, juin 1977.
- [375] C. Le May, J. M. Berger, A. Lespine, B. Pillot, X. Prieur, E. Letessier, M. M. Hussain, X. Collet, B. Cariou, et P. Costet, « Transintestinal Cholesterol Excretion Is an Active Metabolic Process Modulated by PCSK9 and Statin Involving ABCB1 », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, avr. 2013.
- [376] L. L. Clarke, « A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine », *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 296, n° 6, p. G1151-1166, juin 2009.
- [377] M. Tasselli, T. Chaumette, S. Paillusson, Y. Monnet, A. Lafoux, C. Huchet-Cadiou, P. Aubert, S. Hunot, P. Derkinderen, et M. Neunlist, « Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice », *Neurogastroenterology & Motility*, vol. 25, n° 3, p. e183-e193, 2013.
- [378] M. C. Camus, M. J. Chapman, P. Forgez, et P. M. Laplaud, « Distribution and characterization of the serum lipoproteins and apoproteins in the mouse, *Mus musculus*. », *J. Lipid Res.*, vol. 24, n° 9, p. 1210-1228, janv. 1983.
- [379] A.-L. Sberna, M. Assem, R. Xiao, S. Ayers, T. Gautier, B. Guiu, V. Deckert, A. Chevriaux, J. Grober, N. L. Guern, J.-P. P. de Barros, D. D. Moore, L. Lagrost, et D. Masson, « Constitutive Androstane Receptor Activation Decreases Plasma Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins and Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 31, n° 10, p. 2232-2239, janv. 2011.
- [380] S. Ishibashi, S. Perrey, Z. Chen, J. Osuga, M. Shimada, K. Ohashi, K. Harada, Y. Yazaki, et N. Yamada, « Role of the Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor Pathway in the Metabolism of Chylomicron Remnants A QUANTITATIVE STUDY IN KNOCKOUT MICE LACKING THE LDL RECEPTOR, APOLIPOPROTEIN E, OR BOTH », *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n° 37, p. 22422-22427, sept. 1996.
- [381] S. Poirier, G. Mayer, S. Benjannet, E. Bergeron, J. Marcinkiewicz, N. Nassoury, H. Mayer, J. Nimpf, A. Prat, et N. G. Seidah, « The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2 », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 4, p. 2363-2372, janv. 2008.
- [382] C. M. Petersen, M. S. Nielsen, A. Nykjær, L. Jacobsen, N. Tommerup, H. H. Rasmussen, H. Røigaard, J. Gliemann, P. Madsen, et S. K. Moestrup, « Molecular Identification of a Novel Candidate Sorting Receptor Purified from Human Brain by Receptor-associated Protein Affinity Chromatography », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 6, p. 3599-3605, juill. 1997.

- [383] S. Orłowski, S. Martin, et A. Escargueil, « P-glycoprotein and “lipid rafts”: some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?) », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, n° 9, p. 1038-1059, mai 2006.
- [384] Y. Lavie et M. Liscovitch, « Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences », *Glycoconj. J.*, vol. 17, n° 3-4, p. 253-259, avr. 2000.
- [385] F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan, et M. C. Willingham, « Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 84, n° 21, p. 7735-7738, nov. 1987.
- [386] C. Marzolini, E. Paus, T. Buclin, et R. B. Kim, « Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance », *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 75, n° 1, p. 13-33, janv. 2004.
- [387] M. F. Fromm, « The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, n° 10, p. 1295-1310, nov. 2002.
- [388] G. Siest, E. Jeannesson, H. Berrahmoune, S. Maumus, J.-B. Marteau, S. Mohr, et S. Visvikis, « Pharmacogenomics and drug response in cardiovascular disorders », *Pharmacogenomics*, vol. 5, n° 7, p. 779-802, oct. 2004.
- [389] I. Cascorbi, « Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs », *Pharmacol. Ther.*, vol. 112, n° 2, p. 457-473, nov. 2006.
- [390] E. Jeannesson, G. Siest, B. Bastien, L. Albertini, C. Aslanidis, G. Schmitz, et S. Visvikis-Siest, « Association of ABCB1 gene polymorphisms with plasma lipid and apolipoprotein concentrations in the STANISLAS cohort », *Clin. Chim. Acta*, vol. 403, n° 1-2, p. 198-202, mai 2009.
- [391] A. C. Rodrigues, I. M. M. Rebecchi, M. C. Bertolami, A. A. Faludi, M. H. Hirata, et R. D. C. Hirata, « High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent », *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 38, n° 9, p. 1389-1397, sept. 2005.
- [392] M. Foucaud-Vignault, Z. Soayfane, C. Ménez, J. Bertrand-Michel, P. G. P. Martin, H. Guillou, X. Collet, et A. Lespine, « P-glycoprotein dysfunction contributes to hepatic steatosis and obesity in mice », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 9, p. e23614, 2011.
- [393] E. E. Windler, P. T. Kovanen, Y. S. Chao, M. S. Brown, R. J. Havel, et J. L. Goldstein, « The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. », *J. Biol. Chem.*, vol. 255, n° 21, p. 10464-10471, oct. 1980.
- [394] B. Angelin, H. Olivecrona, E. Reihné, M. Rudling, D. Ståhlberg, M. Eriksson, S. Ewerth, P. Henriksson, et K. Einarsson, « Hepatic cholesterol metabolism in estrogen-treated men », *Gastroenterology*, vol. 103, n° 5, p. 1657-1663, nov. 1992.
- [395] P. Parini, B. Angelin, et M. Rudling, « Importance of estrogen receptors in hepatic LDL receptor regulation », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, n° 9, p. 1800-1805, sept. 1997.
- [396] I. F. Godsland, « Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein (a) concentrations: analysis of studies published from 1974–2000 », *Fertility and Sterility*, vol. 75, n° 5, p. 898-915, mai 2001.
- [397] L.-P. Duan, H. H. Wang, A. Ohashi, et D. Q.-H. Wang, « Role of intestinal sterol transporters Abcg5, Abcg8, and Npc1l1 in cholesterol absorption in mice: gender and age effects », *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 290, n° 2, p. G269-276, févr. 2006.
- [398] L.-M. Holbrook, N. A. Watkins, A. D. Simmonds, C. I. Jones, W. H. Ouwehand, et J. M. Gibbins, « Platelets release novel thiol isomerase enzymes which are recruited to the cell surface following activation », *Br. J. Haematol.*, vol. 148, n° 4, p. 627-637, févr. 2010.
- [399] A. Bruneel, V. Labas, A. Mailloux, S. Sharma, N. Royer, J. Vinh, P. Pernet, M. Vaubourdolle, et B. Baudin, « Proteomics of human umbilical vein endothelial cells applied to etoposide-induced apoptosis », *Proteomics*, vol. 5, n° 15, p. 3876-3884, oct. 2005.
- [400] B. Rohe, S. E. Safford, I. Nemere, et M. C. Farach-Carson, « Identification and characterization of 1,25D3-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D3-MARRS)-binding protein in rat IEC-6 cells », *Steroids*, vol. 70, n° 5-7, p. 458-463, mai 2005.
- [401] J.-L. Berry et N. J. Balleid, « ERp57 is involved in the oxidative folding of the low-density lipoprotein receptor in the endoplasmic reticulum », *Bioscience Horizons*, févr. 2009.
- [402] C. E. Jessop, S. Chakravarthi, N. Garbi, G. J. Hämmerling, S. Lovell, et N. J. Balleid, « ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains », *EMBO J*, vol. 26, n° 1, p. 28-40, janv. 2007.

- [403] D. J. Chivers et C. M. Hladik, « Morphology of the gastrointestinal tract in primates: comparisons with other mammals in relation to diet », *J. Morphol.*, vol. 166, n° 3, p. 337-386, déc. 1980.
- [404] R. J. Deckelbaum, R. S. Lees, D. M. Small, S. E. Hedberg, et S. M. Grundy, « Failure of Complete Bile Diversion and Oral Bile Acid Therapy in the Treatment of Homozygous Familial Hypercholesterolemia », *New England Journal of Medicine*, vol. 296, n° 9, p. 465-470, 1977.
- [405] W. C. Duane, D. M. Wiegand, et C. E. Sievert, « Bile acid and bile salt disrupt gastric mucosal barrier in the dog by different mechanisms », *Am. J. Physiol.*, vol. 242, n° 2, p. G95-99, févr. 1982.
- [406] W. C. Duane et D. M. Wiegand, « Mechanism by which bile salt disrupts the gastric mucosal barrier in the dog », *J. Clin. Invest.*, vol. 66, n° 5, p. 1044-1049, nov. 1980.
- [407] E. J. Dial, S. H. M. Rooijakkers, R. L. Darling, J. J. Romero, et L. M. Lichtenberger, « Role of phosphatidylcholine saturation in preventing bile salt toxicity to gastrointestinal epithelia and membranes », *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 23, n° 3, p. 430-436, 2008.
- [408] A. F. HOFMANN et B. BORGSTROEM, « THE INTRALUMINAL PHASE OF FAT DIGESTION IN MAN: THE LIPID CONTENT OF THE MICELLAR AND OIL PHASES OF INTESTINAL CONTENT OBTAINED DURING FAT DIGESTION AND ABSORPTION », *J. Clin. Invest.*, vol. 43, p. 247-257, févr. 1964.

CARACTERISATION DES DETERMINANTS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE L'EXCRETION TRANSINTESTINALE DU CHOLESTEROL

L'objectif de cette thèse a été d'apporter une base moléculaire aux mécanismes mis en jeu dans l'excrétion transintestinale du cholestérol (TICE). Cette voie, complémentaire à la voie biliaire, permet l'efflux du cholestérol plasmatique directement à travers la muqueuse intestinale.

Au cours de ma thèse, J'ai mis en évidence que le TICE est un processus métabolique actif sensible à la température et à l'oxygène. J'ai démontré *in vivo* et *ex vivo* chez la souris mais également pour la première fois *ex vivo* chez l'homme, qu'à la fois les lipoprotéines plasmatiques de type LDL (Low density lipoprotein) ou HDL (High density lipoprotein) peuvent fournir du cholestérol au TICE. Bien que le LDLR (récepteur au LDL) ne soit pas indispensable au TICE, la modulation de son expression affecte le TICE. Ainsi, l'absence de PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin / kexin type 9), un inhibiteur endogène du LDLR, ou un régime enrichi en statines augmentent l'expression intestinale du LDLR et stimulent le TICE. Enfin, j'ai également montré que le TICE est inductible par la diosgénine, un stéroïde végétal connu pour ses propriétés hypocholestérolémiantes. Les mécanismes moléculaires impliqués restent néanmoins à être identifiés. Au niveau apical, le transporteur multidrogues ABCB1 participe avec l'hétérodimère ABCG5/G8 à l'efflux entérocytaire du cholestérol.

Mes travaux de thèse ont contribué à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le fonctionnement et la régulation de cette voie. Sa caractérisation pourrait permettre à terme d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour lutter contre l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires chez l'homme.

MOTS CLES

Excrétion transintestinale du cholestérol (TICE), excrétion biliaire du cholestérol, lipoprotéines, LDLR, PCSK9, ABCB1, diosgénine, souris

CHARACTERIZATION OF THE MOLECULAR DETERMINANTS INVOLVED IN THE REGULATION OF TRANS-INTESTINAL CHOLESTEROL EXCRETION

The aim of this thesis was to provide a molecular basis for the mechanisms involved in transintestinal cholesterol excretion (TICE). This pathway, complementary to the biliary pathway, allows the plasma cholesterol efflux directly through the intestinal mucosa.

During my thesis, I have shown that TICE is an active metabolic process, temperature and oxygen -sensitive. I have demonstrated *in vivo* and *ex vivo* in mice but also for the first time *ex vivo* in humans, that both types of plasma lipoproteins LDL (Low density lipoprotein) and HDL (High density lipoprotein) can provide cholesterol for TICE. Even if the LDLR (LDL receptor) is not essential for TICE, its expression modulation affects TICE. Thus, the absence of PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin / kexin type 9), an endogenous inhibitor of the LDLR or a statins-enriched diet, increase LDLR intestinal expression and stimulate TICE. Finally, I also found that TICE is inducible by diosgenin, a plant steroid known for its cholesterol-lowering properties. However, the molecular mechanisms involved remain to be identified. At the apical level, the multidrug transporter ABCB1 is involved with the heterodimer ABCG5/G8, in the enterocyte cholesterol efflux.

During my PhD training, I have contributed to a better understanding of the molecular mechanisms involved in this pathway. Its characterization could eventually lead to open new therapeutic perspectives in the struggle against high cholesterol and cardiovascular disease in humans.

KEY WORDS

Transintestinal cholesterol excretion (TICE), biliary cholesterol efflux, lipoproteins, LDLR, PCSK9, ABCB1, diosgenin, mice

Jean-Mathieu BERGER

L'institut du thorax, Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291

IRT -UN, 8 quai Moncoussu

44007 NANTES