

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPORTANCE DE LA CAVÉOLINE-1, DU RÉCEPTEUR "SCAVENGER" DE  
CLASSE B, TYPE I ET DU "CLUSTER" DE DIFFÉRENCIATION-36 DANS LE  
MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES NATIVES ET OXYDÉES AU NIVEAU  
DES CELLULES HÉPATIQUES

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR  
TO QUYEN TRUONG

OCTOBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## AVANT-PROPOS

Cette thèse de recherche comporte quatre articles de recherche dont voici les précisions sur ma contribution à chacun des articles.

Chapitre 2: Ce premier article de recherche est une collaboration aux travaux de Jany Lapointe (M.Sc.). Ma contribution est soutenue dans plusieurs facettes expérimentales. J'ai mis au point avec elle le protocole d'isolement des cellules parenchymateuses et non parenchymateuses ainsi que la réalisation des immunobuvardages. Enfin, j'ai aussi collaboré à la révision scientifique du manuscrit.

Chapitre 3 : Pour ce deuxième article de recherche, j'ai élaboré le plan expérimental, réalisé les expériences et rédigé le papier en entier tout en bénéficiant des suggestions et commentaires de madame Louise Brissette. Dominique Aubin et Philippe Bourgeois ont aussi contribué au titre de stagiaires pour la réalisation d'une partie de ce projet. Enfin, madame Louise Falstrault a contribué en assurant une aide technique, notamment dans le marquage radioactif des lipoprotéines.

Chapitre 4 : J'ai rédigé entièrement ce troisième article, élaboré le plan expérimental et réalisé toutes les expériences dont certaines ont été réalisées avec Dominique Aubin (M.Sc.) et madame Louise Falstrault. Le maintien des colonies de souris et le génotypage des souris déficientes en SR-BI, déficientes en CD36 et doublement déficientes en SR-BI et CD36 étaient sous la responsabilité de Mathieu Brodeur (M.Sc.) et Vilay Luangrath (M.Sc.). Je remercie David Rhains (Ph.D.) et Frédéric Letarte (M.Sc.) pour les cellules HepG2 surexprimant SR-BI ou CD36. Enfin, j'ai aussi bénéficié des suggestions et commentaires de madame Louise Brissette.

Chapitre 5 : J'ai rédigé ce papier en entier, élaboré le plan expérimental et réalisé toutes les expériences dont certaines ont été réalisées en collaboration avec madame Louise Falstrault. Je remercie Dominique Aubin pour sa participation comme stagiaire à la construction du

vecteur d'expression de la cavéoline-1 ainsi que de certains immunobuvardages. Ce manuscrit a été commenté et révisé par madame Louise Brissette.

Ces travaux sont le fruit de ces nombreuses années de recherche doctorale pendant lesquelles j'ai passé des moments forts mémorables tant au plan scientifique que personnel dont plusieurs remerciements suivent. Tout d'abord, à une directrice de recherche hors pair qui m'a vu évoluer au cours des multiples années sous sa supervision. Merci sincèrement à toi Louise B. pour ta rigueur scientifique, ta grande disponibilité et surtout ta chaleur humaine. Tu es notre notre mère poule du labo! J'emporte avec moi tous tes conseils constructifs et surtout je garderai de longs souvenirs sur nos conversations en privé de nos obstacles dans la vie. Je remercie également tous les membres du laboratoire du Métabolisme des lipoprotéines présents et passés et que j'ai eu la chance de côtoyer: Jany, Anick, Frédéric, Philippe, Karine, Geneviève, Jennifer, Mathieu, Vilay, Pascale, Léo, Vénéta et Fati. Un gros merci spécialement à une assistante de recherche dévouée: Louise Falstrault. Je suis totalement reconnaissante pour tout ton travail bien fait pour que je puisse finaliser mes travaux de recherche. Enfin, à une personne que j'admire beaucoup dû à son parcours académique hors de l'ordinaire, Dominique Aubin. Merci d'avoir participer activement et positivement à mes travaux de recherche. Je garderai de très bons souvenirs de toutes tes gaffes mais aussi de notre grande amitié qui s'est installée pour y rester.

Ses années sont aussi accompagnées de nombreux supports au plan familial. J'ai vécu des moments très heureux comme l'union de mon mariage en 2002 avec l'homme de ma vie, Phan Van Nguyen. Il m'a apporté un équilibre que je recherchais et surtout son amour inconditionnel. Merci de ta patience, de ton écoute et surtout de ton support financier. "I love you for making me the woman that I am today and I thank you for your support that you gave me throughout these years. You are more than a husband; you are my best friend who always makes sure that I have all the best things in this world. I am now standing thick and tall behind my man; it's your time to shine". De l'autre côté, j'ai aussi vécu des moments déchirants comme la mort subite de mon beau-père en 2005. Ces moments ont été douloureux pour notre famille car il laisse dans le deuil plusieurs membres de la famille qui l'aimaient mais aussi sa femme solitaire et démunie intellectuellement. Cette tragédie m'a permis de

comprendre que la vie est tellement fragile et qu'elle mérite de la vivre pleinement et sainement. Je remercie également mes parents qui m'ont vu grandir, quitter le nid familial et maintenant former ma propre famille. Je vois la fierté que vous dégagez au travers de vos yeux pour l'accomplissement de toutes mes études. Qui ne peut être plus fier d'avoir élevé huit enfants, tous bacheliers universitaires et menant maintenant des carrières professionnelles. À mes sœurs, frère, beaux-frères, belle-sœur, nièces et neveux, merci pour votre appui familial et surtout de votre écoute lors de mes moments les plus difficiles. À ma cousine et amis, merci de rendre nos petites soirées en moments de détente. Enfin, à la nouvelle joie de ma vie, à ce petit bout de chou qui grandit tous les jours, maman est fière de voir toutes tes prouesses. Je comprends maintenant toutes les mères dont les yeux brillent en parlant de leurs enfants. C'est tout simplement un réflexe maternel dont la joie ne s'explique pas! Jeremy, tu es mon petit trésor et je te dédie cette thèse.

## TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS .....	ii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
RÉSUMÉ.....	xii
CHAPITRE 1: État des connaissances.....	1
1.1 Les lipoprotéines .....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Les lipoprotéines natives.....	2
1.1.2 Les lipoprotéines oxydées.....	4
1.2 Les apolipoprotéines .....	6
1.3 Les récepteurs.....	6
1.3.1 Le récepteur menant à une voie endosomale/lysosomale: le récepteur de LDL (rLDL)..	7
1.3.2 Les récepteurs impliqués dans la voie de captation sélective.....	9
1.3.2.1 Le récepteur "scavenger" de classe B, type I (SR-BI).....	11
1.3.2.2 Le "Cluster of differentiation 36" (CD36).....	18
1.4 Transport inverse et efflux de cholestérol .....	21
1.4.1 Diffusion passive.....	22
1.4.2 Diffusion facilitée par la cavéole/cavéoline .....	23
1.4.2.1 Les microdomaines membranaires .....	23
1.4.2.2 La cavéole .....	24
1.4.2.3 Les cavéolines .....	28
1.4.2.3.1 Cavéoline-1 ou VIP21 ("Vesicular Integral Protein – 21 kDa") .....	30
1.4.2.3.2 Cavéoline-2 .....	33
1.4.2.3.3 Cavéoline-3 ou M-cavéoline .....	34
1.4.3 Diffusion facilitée par SR-BI/BII ou CD36.....	34
1.4.3.1 Rôle de SR-BI/BII dans l'efflux de cholestérol .....	34
1.4.3.2 Rôle de CD36 dans l'efflux de cholestérol.....	35
1.4.4 Transport actif médié par la protéine "ATP-Binding Cassette" (ABC) .....	36

1.4.4.1 La protéine ABCA1.....	37
1.4.4.2 La protéine ABCG1.....	40
1.5 Le modèle de l'étude: le foie.....	40
1.5.1 Le morphologie du foie.....	40
1.5.2 Les types cellulaires hépatiques.....	41
1.5.2.1 Les cellules parenchymateuses.....	41
1.5.2.2 Les cellules non-parenchymateuses.....	42
1.5.3 Les fonctions du foie.....	43
1.5.3.1 Métabolisme.....	43
1.5.3.2 Métabolisation des drogues.....	43
1.5.3.3 Formation de la bile.....	44
1.6 Problématique, buts et hypothèses de travail.....	44
CHAPITRE 2: Differential Abilities of Mouse Liver Parenchymal and Nonparenchymal Cells Towards HDL and LDL (Native and Oxidized) Association and Cholesterol Efflux.....	48
CHAPITRE 3: Opposite Effect of Caveolin-1 in the Metabolism of High-Density and Low-Density Lipoproteins.....	66
CHAPITRE 4: Scavenger Receptor Class B Type I, Cluster of Differentiation 36 and Caveolin-1 Contribute Positively to Cholesterol Efflux in Hepatic Cells.....	102
CHAPITRE 5: Importance of caveolin-1 in the Metabolism Of Oxidized LDL in HepG2 cells.....	127
CHAPITRE 6: Conclusion.....	147
RÉFÉRENCES.....	154

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre 1

Figure 1 :	Structure d'une lipoprotéine coupée (A) et représentations graphiques des différentes classes de lipoprotéines (B).....	2
Figure 2 :	Endocytose des LDL par le rLDL.....	9
Figure 3 :	Structure du SR-BI.....	13
Figure 4 :	Transport inverse du cholestérol.....	22
Figure 5 :	Radeau lipidique versus cavéole.....	24
Figure 6 :	Domaines structuraux de la cavéoline-1.....	29
Figure 7 :	La famille des cavéolines.....	31
Figure 8 :	Structure de la protéine ABCA1.....	38
Figure 9 :	Structure de la protéine ABCG1.....	41

### Chapitre 2

Figure 1:	Analysis of the cell purity by FACS separation.....	63
Figure 2:	Immunoblot analysis of SR-BI, CD36, LDLr and caveolin-1 expression in mouse hepatic parenchymal and nonparenchymal cells .....	64
Figure 3:	[ <sup>3</sup> H]CE and <sup>125</sup> I-protein association of HDL and LDL and oxLDL with primary cultures of mouse liver parenchymal and nonparenchymal cells.....	65

### Chapitre 3

Figure 1:	Western blot analysis of caveolin-1 levels in HepG2 cells, liver mouse tissue, Y1-BS1 cells and normal human skin fibroblasts (hFb).....	91
Figure 2:	Detection of caveolin-1 transcript and protein in different subtypes of HepG2 cells.....	92



Figure 3:	Subcellular fractionation of different subtypes of HepG2 cells and Y1-BS1 cells.....	93
Figure 4:	Immunofluorescence analysis of Y1-BS1 cells and HepG2 cells expressing caveolin-1.....	94
Figure 5:	Colocalization of caveolin-1 and LDLr or caveolin-1 and CD36 in HepG2 cells expressing caveolin-1.....	95
Figure 6:	Immunoblotting of control (A) and caveolin-1 expressing HepG2 cell (B) proteins fractionated by discontinuous sucrose gradient.....	96
Figure 7:	BSA uptake and cholesterol efflux.....	97
Figure 8:	Western blot analysis of ABCA1, LDLr, SR-BI, SR-BII and $\beta$ -actin levels in different subtypes of HepG2 cells.....	98
Figure 9:	HDL <sub>3</sub> binding, LDL binding and LDL degradation.....	99
Figure 10:	LDL-CE and HDL <sub>3</sub> -CE selective uptake.....	100
Figure 11:	SR-BI/BII immunoblotting of control treated or not with cholesterol oxidase and sphingomyelinase and of caveolin-1 expressing HepG2 cell proteins fractionated by discontinuous sucrose gradient.....	101
Chapitre 4		
Figure 1:	Immunoblotting of HepG2 cells, SR-BI(+), CD36(+), Cav1/SR-BI+ and Cav1/CD36+ proteins fractionated by discontinuous sucrose gradient. ....	122
Figure 2:	Expression levels of SR-BI, SR-BII, CD36, caveolin-1 and ABCA1 in different subtypes of HepG2 cells.....	123
Figure 3:	Efflux of [ <sup>3</sup> H]-cholesterol to HDL <sub>3</sub> in different subtypes of HepG2 cells. ....	124
Figure 4:	Efflux of [ <sup>3</sup> H]-cholesterol to HDL <sub>3</sub> in mouse hepatic cells.....	125
Figure 5:	Immunoblotting of normal mouse hepatic cell protein fractionated by discontinuous sucrose gradient.....	126

## Chapitre 5

Figure 1:	Mildly and standardly oxLDL binding and degradation.....	143
Figure 2:	Mildly oxLDL-CE and standardly oxLDL-CE selective uptake.....	144
Figure 3:	Cholesterol efflux.....	145
Figure 4:	Expression of SR-BI (A), LDLr (B), CD36 (C) and caveolin-1 (D) treated with different concentration (0 to 1000 µg/ml) of native LDL, mildly oxLDL and standardly oxLDL in control and Cav13 cells.....	146

## Chapitre 6

Figure 1:	Différences entre les cellules parenchymateuses et cellules non-parenchymateuses.....	148
Figure 2:	Différences entre les cellules HepG2 et cellules HepG2 exprimant la cavéoline-1.....	153

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre 1

Tableau I:	Les caractéristiques physiques et chimiques des différentes classes de lipoprotéines chez l'homme, leurs principales fonctions et leurs principaux sites de synthèse.....	3
Tableau II:	Classification des apolipoprotéines.....	6
Tableau III:	Récepteurs hépatiques des LDL et HDL.....	7
Tableau IV:	Modèles de souris transgéniques et déficientes.....	18
Tableau V:	Liste partielle des molécules présentes dans la cavéole.....	26
Tableau VI:	Cavéolines: nomenclature, tissus et propriétés.....	29

### Chapitre 2

Tableau I:	Parenchymal and nonparenchymal cell cholesterol efflux to HDL.....	61
------------	--	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC:	"ATP-Binding Cassette"
ABCA1:	"ATP-Binding Cassette" A1
ABCG1:	"ATP-Binding Cassette" G1
ACAT:	Acyl coenzyme A: cholestérol acyltransférase
Apo:	Apolipoprotéine
CD36:	"Cluster of differentiation 36"
CL:	Cholestérol libre
EC:	Esters de cholestérol
HB2:	"High-density lipoprotein binding protein 2"
HDL:	Lipoprotéines de haute densité
HMGCoA-réductase:	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase
IDL:	Lipoprotéines de densité intermédiaire
LCAT:	Lécithine : cholestérol acyltransférase
LDL:	Lipoprotéines de faible densité
LDLac:	LDL acétylées
LDLox:	LDL oxydées
LRP:	Protéine apparentée au rLDL
LH:	Lipase hépatique
LPL:	Lipoprotéine lipase
M-BSA:	Albumine de sérum bovin maléylée
MCV :	Maladies cardiovasculaires
PL:	Phospholipide
rLDL:	Récepteur de LDL
SLL:	Site de liaison des lipoprotéines
SREBP:	"Sterol regulatory element binding protein"
SR-BI:	Récepteur "scavenger" de classe B type I
VLDL:	Lipoprotéines de très faible densité
TG:	Triacylglycérols

## RÉSUMÉ

Le cholestérol est souvent perçu comme néfaste à la santé mais c'est un constituant essentiel pour l'élaboration de la membrane cellulaire, la synthèse de certaines hormones stéroïdiennes et des acides biliaires. Vu l'augmentation fulminante de maladies cardiovasculaires reliées à un excès de cholestérol dans la circulation sanguine qui se traduit par un dépôt au niveau de la paroi de l'artère, il est nécessaire de pousser les connaissances sur le métabolisme du cholestérol. Sachant que le cholestérol est transporté dans le système circulatoire par le biais de lipoprotéines et que les apolipoprotéines de ces dernières interagissent avec les récepteurs cellulaires, il est primordial de mettre en évidence ces voies impliquées dans la captation des lipoprotéines. Il existe plusieurs classes de récepteurs de lipoprotéines à la surface cellulaire dont l'une mène à l'internalisation et une dégradation complète de la particule. L'exemple le plus connu de cette classe est le récepteur de LDL (rLDL). L'autre classe peut capter sélectivement les esters de cholestérol (EC) des lipoprotéines de faible densité (LDL) ou lipoprotéines de haute densité (HDL), sans toutefois entraîner une captation et dégradation parallèle de leurs apolipoprotéines. Les deux récepteurs impliqués dans la captation sélective des EC sont le "cluster of differentiation" (CD36) et le récepteur "scavenger" de type B, classe I (SR-BI). Ces récepteurs se retrouvent dans le foie mais au moment où ces études doctorales ont été amorcées ils avaient été caractérisés surtout dans les cellules extrahépatiques et colocalisés dans les cavéoles, des invaginations membranaires absentes du foie.

Notre première étude a permis de démontrer que, dans les cellules hépatiques de souris, la captation sélective des EC peut se faire autant par les cellules parenchymateuses que non parenchymateuses. Cependant, seulement les cellules parenchymateuses peuvent soutirer les EC à partir des trois classes, soient les HDL, LDL et LDL oxydées (LDLox) tandis que les cellules non parenchymateuses le font qu'à partir des LDL et LDLox. De plus, les cellules parenchymateuses expriment plus de rLDL, SR-BI et CD36 que les cellules non parenchymateuses. Cependant, la cavéoline-1 est détectable seulement dans les cellules non parenchymateuses.

En second lieu, nous avons voulu définir l'implication de la cavéoline-1 exprimée dans la cellule HepG2 normale (un hépatome humain) au niveau du métabolisme des LDL et HDL. Pour ce faire, l'ADN complémentaire (ADNc) de la cavéoline a été inséré en orientation sens dans le vecteur d'expression eucaryote (pRc/CMV) puis transfecté dans des cellules HepG2. L'expression de la cavéoline-1 génère une augmentation de la captation de l'albumine et de l'efflux de cholestérol suggérant la formation de cavéoles. Les cellules HepG2 exprimant la cavéoline-1 révèlent une augmentation de 108% de la dégradation des LDL, une augmentation de 55% de la captation sélective des EC à partir des HDL mais une diminution de 66% pour celle des LDL. De plus, notre étude démontre qu'il y a une plus de colocalisation entre la cavéoline-1 et le CD36 ou le rLDL qu'entre la cavéoline-1 et le SR-BI. Par contre, la présence de la cavéoline-1 augmente la forme dimérique du SR-BI. Ainsi, l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules HepG2 favorise la captation sélective des EC à partir des HDL ainsi que la dégradation des LDL tandis que dans les cellules normales HepG2, la voie de captation sélective des EC des LDL est favorisée.

En troisième lieu, comme le foie génère une quantité substantielle de cholestérol, nous avons étudié l'efflux de cholestérol sur de multiples lignées de cellules HepG2 ainsi que les cellules hépatiques de foie de souris. Nos études démontrent que la surexpression de SR-BI, de CD36 et de la cavéoline-1 dans les cellules HepG2 génère une augmentation de l'efflux de cholestérol de 106%, 92% et 48% respectivement. De plus, une double surexpression de SR-BI et de la cavéoline-1 ou de CD36 et de la cavéoline-1 induit une hausse plus importante de l'efflux de cholestérol. Les expériences réalisées avec les cellules hépatiques de souris en culture primaire ont révélé une diminution de 41% et 56% de l'efflux de cholestérol pour les cellules de souris déficientes en SR-BI ou doublement déficientes en SR-BI et CD36 respectivement. Cependant, aucune différence significative n'a été observée pour les souris déficientes en CD36. Ainsi, les résultats suggèrent que le SR-BI est impliqué autant dans l'efflux de cholestérol chez les cellules hépatiques de souris que chez l'humain tandis que CD36 ne l'est que chez l'humain.

Nos derniers travaux visaient à élucider l'importance de la cavéoline-1 dans le métabolisme des LDLox. Nos résultats révèlent que la cavéoline-1 a le potentiel d'augmenter autant la liaison que la dégradation des LDL légèrement (LDLlox) que fortement oxydées (LDLfox). Par contre, la présence de la cavéoline-1 affecte seulement la captation sélective des EC en diminuant de 50% celle des LDLlox et pas celle des LDLfox. Cette étude démontre aussi une augmentation de 27% de l'efflux de cholestérol à partir de LDLlox mais une diminution de 22% à partir des LDLfox. Enfin, l'expression de la cavéoline-1 stabilise les niveaux de SR-BI et de rLDL lorsque les cellules HepG2 sont traitées avec les LDLox (lox et fox) mais n'a pas d'impact sur le niveau de CD36. Ces résultats suggèrent que l'importance physiologique de l'expression de la cavéoline-1 hépatique est dans le rôle de l'épuration (dégradation) de ces particules athérogènes.

En conclusion, l'ensemble des travaux rapportés dans cette thèse supporte que l'expression de la cavéoline-1 au niveau hépatique grâce à une modulation biotechnologique aurait un rôle clé dans l'homéostasie du cholestérol hépatique, puisqu'elle affecte à la hausse l'efflux de cholestérol et module la captation sélective à partir des LDL, HDL et LDL oxydées.

Mots clés: foie, lipoprotéines, cavéoline, récepteurs, oxydation.

## CHAPITRE 1: État des connaissances

### 1.1 Les lipoprotéines

#### 1.1.1 Généralités

Les lipoprotéines (lipides-protéines) sont synthétisées principalement par le foie et dans une moindre mesure par l'intestin. Le rôle principal des lipoprotéines est le transport des lipides, tels les triacylglycérols (TG), le cholestérol et ses esters, vers divers tissus où des enzymes et récepteurs spécifiques se chargent de leurs destinées. Ces complexes de lipides et de protéines spécifiques (apolipoprotéines ou apoprotéines, (apo)) ont une organisation structurale commune qui est caractérisée par une région centrale hydrophobe contenant des quantités variables de TG et d'esters de cholestérol (EC), projetant dans l'environnement aqueux le domaine hydrophile des phospholipides (PL), des apolipoprotéines et de cholestérol libre (CL).

Le cholestérol est un composant de notre diète et un constituant principal des lipoprotéines plasmatiques. Ainsi, la présence du cholestérol dans la circulation plasmatique assure un apport essentiel et continu aux cellules. En plus de son rôle de précurseur d'hormones stéroïdiennes, de la vitamine D<sub>3</sub> et des acides biliaires, le cholestérol est un constituant universel qui participe à l'élaboration des structures membranaires de toutes les cellules eucaryotes. De même, les phospholipides retrouvés dans les lipoprotéines servent eux aussi à la formation des membranes plasmiques. D'autre part, les apolipoprotéines, qui sont des constituants structuraux très importants des lipoprotéines, participent à la synthèse, la sécrétion, l'élaboration ainsi qu'au catabolisme des lipoprotéines. Elles ont un rôle clé en tant qu'effecteur au niveau des réactions métaboliques et cataboliques impliquant des lipoprotéines. En effet, les apolipoprotéines permettent la liaison des lipoprotéines aux différents récepteurs cellulaires qui se traduit par une internalisation suivie d'une dégradation de la lipoprotéine toute entière ou d'un passage d'une partie des esters de cholestérol (EC) des lipoprotéines vers la cellule.

### 1.1.2 Les lipoprotéines natives

Les lipoprotéines plasmatiques se regroupent en différentes classes (figure 1). Celles-ci ont des tailles, des poids et des densités différents. Elles peuvent être décrites par leur contenu en lipides et en protéines, leur fonction et leur site de synthèse (tableau I). Décrivons-les en ordre croissant de densité.

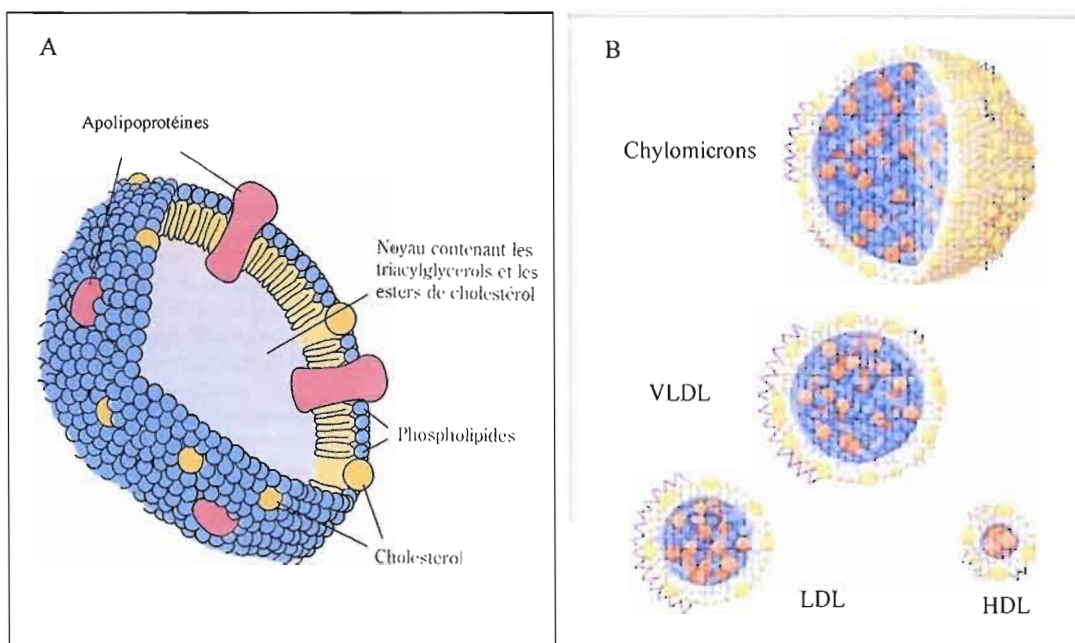


Figure 1: Structure d'une lipoprotéine coupée (A) et représentations graphiques des différentes classes de lipoprotéines (B).

Les chylomicrons, composés majoritairement de TG (85%), forment la première classe de lipoprotéines avec une densité plus petite que 0,95 g/ml. Ils sont synthétisés par l'intestin dans les cellules muco-sales du duodénum et du jéjunum pendant l'absorption de lipides alimentaires (Scanu 1986), plus particulièrement au niveau du réticulum endoplasmique avant de se rendre à l'appareil de Golgi pour ensuite être relargués dans le sang selon un processus d'exocytose (Havel & Hamilton 1988). Leur fonction principale réside dans le transport d'acides gras sous forme de TG aux sites cellulaires de captation et d'utilisation (Scanu 1986).



Tableau I: Les caractéristiques physiques et chimiques des différentes classes de lipoprotéines chez l'homme, leurs principales fonctions et leurs sites principaux de synthèse.

	Densité (g/ml)	Composition en apos	Fonction principale	Sites de synthèse principaux où provenance
Chylomicrons	<0,95	A,B <sub>48</sub> ,C,E	Transport des TG	Intestin
VLDL	0,95-1,006	B <sub>100</sub> ,C,E	Transport des TG	Foie (85%) Intestin (15%)
IDL	1,006-1,019	B <sub>100</sub> ,C,E	Transport des TG	Catabolisme des VLDL
LDL	1,019-1,063	B <sub>100</sub>	Transport du cholestérol	Catabolisme des IDL
HDL:	1,063-1,21	A,C,E	Transport du cholestérol	Intestin Foie Catabolisme des chylomicrons et VLDL
HDL <sub>2</sub>	1,063-1,125	A,C,E		
HDL <sub>3</sub>	1,125-1,21	A,C		

La seconde classe rassemble les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) dont la densité varie de 0,95 à 1,006 g/ml. Tout comme les chylomicrons, elles contiennent majoritairement de TG (50%) (Tortora & Grabowsky 1993) et jouent un rôle dans le transport des acides gras des cellules hépatiques vers les autres cellules. Les VLDL sont synthétisées par le foie (85%) à partir des lipides endogènes et par les entérocytes (15%). Un régime alimentaire riche en lipides favorise la production de VLDL et la formation de plaques athéromateuses associées aux maladies cardiovasculaires (MCV) (Tortora & Grabowsky 1993).

La troisième classe importante de lipoprotéines regroupe les lipoprotéines de faible densité (LDL) ayant une densité allant de 1,019 à 1,063 g/ml. Elles contiennent 23% de protéines, 10% de TG, 8% de CL, 37% de d'EC et 20% de PL (Tortora & Grabowsky 1993). Les LDL sont issues du catabolisme des VLDL (Sigurdsson et al. 1975). Une fois dans la circulation, les TG des VLDL sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) (Schaefer et al. 1978). Ce processus mène à la formation des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL: 1,006 à 1,019 g/ml) qui sont des résidus transitoires du catabolisme des VLDL. D'après Janus et al. (1980), 50% des IDL est converti en LDL chez l'humain sous l'action de la LPL et de la lipase hépatique (LH). Les LDL sont épurées par le récepteur de LDL (rLDL) (Brown et al. 1974) qui reconnaît les apoB<sub>100</sub> et apoE. Une fois liées, les LDL sont internalisées et dégradées dans les lysosomes alors que le récepteur est recyclé vers la membrane plasmique pour se retrouver dans les puits tapissés de clathrine.

La dernière classe de lipoprotéines réunit les lipoprotéines de haute densité (HDL) dont la densité oscille entre 1,063 et 1,21 g/ml. Elles contiennent 55% de protéines, 4% de TG, 2% de CL, 15% d'EC et 24% de PL (Tortora & Grabowski 1993). Elles sont synthétisées au niveau du foie et de l'intestin ou sont des descendantes directes des produits du catabolisme des chylomicrons par dissociation des apoA et apoC ou des VLDL durant la lipolyse hépatique (Havel & Hamilton 1988). Cependant, leur origine majeure semble être liée à la maturation des HDL naissantes de forme discoïdale en particules sphériques ayant la densité des HDL<sub>3</sub>. Cette maturation nécessite l'apport du CL des tissus périphériques qui est estérifié par la lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT) associée aux HDL (Glomset 1968). On peut différencier deux sous-classes majeures de HDL: les HDL<sub>2</sub> de densité de 1,063 à 1,125 g/ml et les HDL<sub>3</sub> de densité de 1,125 à 1,21 g/ml.

Les lipoprotéines des différentes classes ont aussi des fonctions et des relations différentes avec l'athérosclérose. Les LDL sont associées positivement avec l'incidence des maladies du coeur puisqu'elles fournissent les EC aux cellules. Par contre, les HDL sont plutôt associées négativement car elles participent au transport inverse du cholestérol des tissus extrahépatiques vers les cellules du foie pour la réutilisation ou l'excrétion biliaire (Glomset 1968).

### 1.1.2 Les lipoprotéines oxydées

Brown et al. (1979) ont démontré que les LDL pouvaient subir des modifications entraînant un changement de conformation de l'apoB, la perte de reconnaissance par le rLDL et leur captation par d'autres récepteurs. Les macrophages internalisent de grandes quantités de LDL oxydées (LDLox) par l'intermédiaire de récepteurs dits éboueurs ("scavenger") qui, à l'inverse du rLDL, ne sont pas sous le contrôle négatif du contenu intracellulaire en cholestérol (Suzuki et al. 1997); ces macrophages deviennent alors des cellules spumeuses.

Le démarrage de l'oxydation se déclenche par un radical libre oxygéné (ROS) qui se traduit par une peroxydation lipidique à la surface de la LDL. Cette initiation est influencée *in vivo* par des facteurs environnementaux, la taille et la composition en acide gras des LDL

(Steinbrecher et al. 1984). L'oxydation est un phénomène qui altère à la fois le statut et la composition de la lipoprotéine dans ses parties lipidique et protéique, une étape favorisant le processus d'athérosclérose. Elle se produit majoritairement in situ, dans la paroi de l'intima (Steinberg 1997A). On ne retrouve en effet que de très faibles quantités de LDLox circulantes alors qu'elles sont présentes en abondance dans la plaque athéromateuse (Chisolm & Steinberg 2000). La propagation du phénomène (oxydation) dépend en partie de l'enzyme PAF-AH ("Platelet Activating Factor-Acetylhydrolase ou lipoprotein-associated phospholipase A2") (Navab et al. 1996). Cette enzyme, principalement associée aux LDL, possède une activité phospholipase A2. Après peroxydation d'une double liaison (C=C) au sein d'un acide gras polyinsaturé, composant d'une molécule d'ester de cholestérol, de PL ou de TG, cette activité peut provoquer une amplification de la peroxydation lipidique, conduisant à une fragmentation d'acides gras polyinsaturés avec génération d'aldéhydes et de cétones. Les cétones sont éliminées, mais les aldéhydes se lient aux résidus lysine de l'apoB<sub>100</sub>, ligand clé du récepteur cellulaire des LDL. Il s'ensuit une modification covalente de l'apoB<sub>100</sub> avec une augmentation de sa charge négative, entraînant une perte de la reconnaissance par le rLDL, mais lui conférant la capacité de se lier à des récepteurs "scavengers" (Steinberg 1997A) qui sont nombreux au niveau des macrophages. Ces récepteurs dont les récepteurs "scavengers" de classe B font partis, c'est-à-dire le récepteur "scavenger" de classe B type I (SR-BI) et le "cluster" de différenciation-36 (CD36) sont décrits plus loin dans cette thèse. Enfin, il est connu que le degré d'oxydation mène à différents stades de l'athérosclérose. Les LDL légèrement oxydées ("mildly oxLDL") entraînent la sécrétion de facteurs inflammatoires et les LDL fortement oxydées ("standardly oxLDL") sont cytotoxiques et conduisent à la formation de cellules spumeuses (Cushing et al. 1990, Rajavashisth et al. 1990, Berliner et al. 1995). Ces dernières cellules sont des macrophages qui augmentent sans cesse leur contenu en EC. À leur tour, ces cellules synthétisent leurs propres facteurs de croissance et cytokines et sont envahies par des lymphocytes qui pénètrent dans l'intima. Ce processus est le début du développement des lésions athérosclérotiques.

## 1.2 Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines, comme toutes les protéines sécrétées, sont synthétisées à la surface du réticulum endoplasmique et transloquées dans la membrane du réticulum endoplasmique pendant le clivage co-traductionnel de leur peptide signal. Ces constituantes se regroupent en différentes classes. On reconnaît quatre grandes familles d'apolipoprotéines, selon la nomenclature proposée par Alaupovic en 1972 (Alaupovic 1972). Leur classification en familles repose sur le degré d'homologie de leur séquence en acides aminés et se retrouve dans le tableau II.

Tableau II: Classification des apolipoprotéines.

Apo	Poids moléculaire (kDa)	Origine	Rôle
A-I	28	Foie Intestin	Activateur de la LCAT et liaison des HDL aux SR-BI, "High-density lipoprotein binding protein 2" (HB <sub>2</sub> ) (Morrison et al. 1991)
A-II	17		Activateur de la LH (Fielding et al. 1972, Vadiveloo et al. 1993) et liaison des HDL aux SR-BI et HB <sub>2</sub> (Fidge 1999)
A-IV	46	Intestin	Activateur de la LPL (Goldberg et al. 1990)
B <sub>48</sub>	240	Foie	Implication dans la lipogenèse (Innerarity et al. 1987)
B <sub>100</sub>	512		Liaison avec le rLDL (Innerarity et al. 1987)
C-I	6,6	Foie Intestin	Activateur de la LCAT (Soutar et al. 1975)
C-II	8,9		Activateur de la LH et LPL (Nikkila 1983)
C-III	8,8		Activateur de la LH et LPL (Kinnunen & Ehnholm 1976, Brown & Baginsky 1972) Inhibiteur de la liaison au rLDL et la protéine apparentée au rLDL (LRP) (Weisgraber et al. 1990)
E	34	Foie Macrophages Cerveau Surrénales	Liaison avec les récepteurs: rLDL (Hui et al. 1984), LRP (Beisiegel et al. 1989), Inhibiteur de la LPL (Rensen & Van Berkel 1996)

## 1.3 Les récepteurs

Les études décrites dans ce projet traitent du catabolisme des LDL et HDL alors nous n'allons que décrire les récepteurs potentiels pour ces lipoprotéines (tableau III). Il y a d'abord les récepteurs impliquant l'endocytose et d'autres récepteurs impliqués dans la captation sélective des EC.

Tableau III: Récepteurs hépatiques des LDL et HDL.

Récepteur	Poids moléculaire (kDa)	Ligands lipoprotéiques et apolipoprotéiques	Fonction
rLDL	160	VLDL, IDL, LDL	Endocytose
SR-BI	80-88	VLDL, LDL, HDL, LDLox, LDLac, ApoA-I, ApoA-II, ApoC-III, ApoE	Captation sélective
CD36	78-88	VLDL, LDL, HDL, LDLox, LDLac	Captation sélective et endocytose

### 1.3.1 Le récepteur menant à une voie endosomale/lysosomale: le récepteur de LDL (rLDL)

Les lipoprotéines comme les LDL sont internalisées via le rLDL qui entraîne l'entrée de la particule entière dans la cellule. Il s'ensuit que les proportions des constituants des lipoprotéines, retrouvées dans la cellule suite à la dégradation des particules, reflètent avec fidélité la composition des lipoprotéines en apolipoprotéines, en EC et en TG pour le maintien du cholestérol tant cellulaire que plasmatique.

Des études structurales et fonctionnelles du rLDL ont contribué énormément à la compréhension de l'homéostasie du cholestérol. Le rLDL a été découvert en 1973 suite à des études effectuées sur des fibroblastes humains en culture (Brown et al. 1973). Plusieurs autres études ont démontré que le foie joue un rôle essentiel dans l'élimination des LDL de la circulation sanguine (Steinberg 1983, Brown & Goldstein 1983). Bien que l'on estime que 70% des rLDL ont une localisation hépatique, on peut en retrouver dans les glandes surrénales, dans les ovaires et dans d'autres tissus (Brown & Goldstein 1983, Havekes et al. 1987). En fait, toutes les cellules ayant besoin de cholestérol sont susceptibles d'exprimer cette protéine à leur surface. De plus, l'importance du rLDL est démontrée par la maladie génétique humaine connue sous le nom d'hypercholestérolémie familiale (HF). Un hétérozygote atteint d'HF est le cas le plus commun des maladies génétiques dominantes autosomales tandis qu'un homozygote est plus rare mais ce dernier démontre des manifestations plus sévères (Brown & Goldstein 1986, Hobbs et al. 1990). On estime que cette maladie affecte une personne sur 500 dans la plupart des populations (Goldstein & Brown 1989). Au Québec, la fréquence d'hétérozygotes affectés par l'HF est plus élevée que dans les autres populations (Goldstein et al. 1983). En effet, elle affecte une personne sur 270

et dans le nord-est du Québec, c'est une personne sur 154 qui est atteinte (Moorjani et al. 1989).

Le rLDL, un récepteur de haute affinité, peut lier les lipoprotéines contenant l'apoB<sub>100</sub> et l'apoE, d'où son autre appellation de récepteur d'apoB,E (Dashti & Wolbauer 1986). Son gène de 45 kb composé de 18 exons et 17 introns (Sudhof et al. 1985) est situé sur le bras court du chromosome 19. C'est une glycoprotéine membranaire dont la structure est hautement conservée chez l'humain et autre espèce animale (Sudhof et al. 1985). Le rLDL est synthétisé dans le réticulum endoplasmique rugueux comme une protéine précurseur puis transporté dans l'appareil de Golgi pour sa maturation. La forme mature du rLDL contient 839 acides aminés et a un poids moléculaire apparent de 160 kDa (Yamamoto et al. 1984).

L'endocytose des LDL par le rLDL est très bien connu. Il a été démontré que les rLDL sont localisés dans les invaginations de la membrane plasmique appelées "coated pits" (Anderson et al. 1975, 1977); ces dépressions membranaires étant quant à elles recouvertes d'une protéine appelée clathrine (Pearse 1976). Récemment, on a démontré que le rLDL peut aussi se retrouver dans les invaginations de type cavéolaire au niveau des hépatocytes de souris (Ness et al. 2003). La liaison des LDL aux rLDL à la surface de la membrane plasmique mène à la formation d'un complexe qui se traduit par une internalisation dans des vésicules par endocytose, suite à un repliement des puits tapissés de clathrine sur eux-mêmes. Une dissociation entre les LDL et les récepteurs s'ensuit puis le récepteur est recyclé à la surface. Les vésicules contenant les LDL se fusionnent aux lysosomes où les apolipoprotéines et les lipides sont dégradés par les enzymes lysosomiales. Ainsi, les protéines seront dégradées en acides aminés, tandis que le cholestérol estérifié sera sujet à une hydrolyse en vue d'obtenir une forme libre de ce composé et un acide gras (figure 2). L'expression du rLDL est importante car elle permet le maintien de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire. Ainsi, le CL nouvellement arrivé provoque une régulation à la baisse de l'expression du gène du rLDL afin de limiter l'assimilation des LDL (Russell et al. 1983). Il y aura aussi un effet similaire sur celle de la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), une enzyme clé dans la synthèse du cholestérol endogène (Brown & Goldstein 1986). De plus, l'expression du gène de l'acyl coenzyme A:cholestérol acyltransférase

(ACAT) est augmentée afin de favoriser l'estérification du cholestérol en excès qui se retrouvera sous la forme de gouttelettes lipidiques (Goldstein et al. 1974).

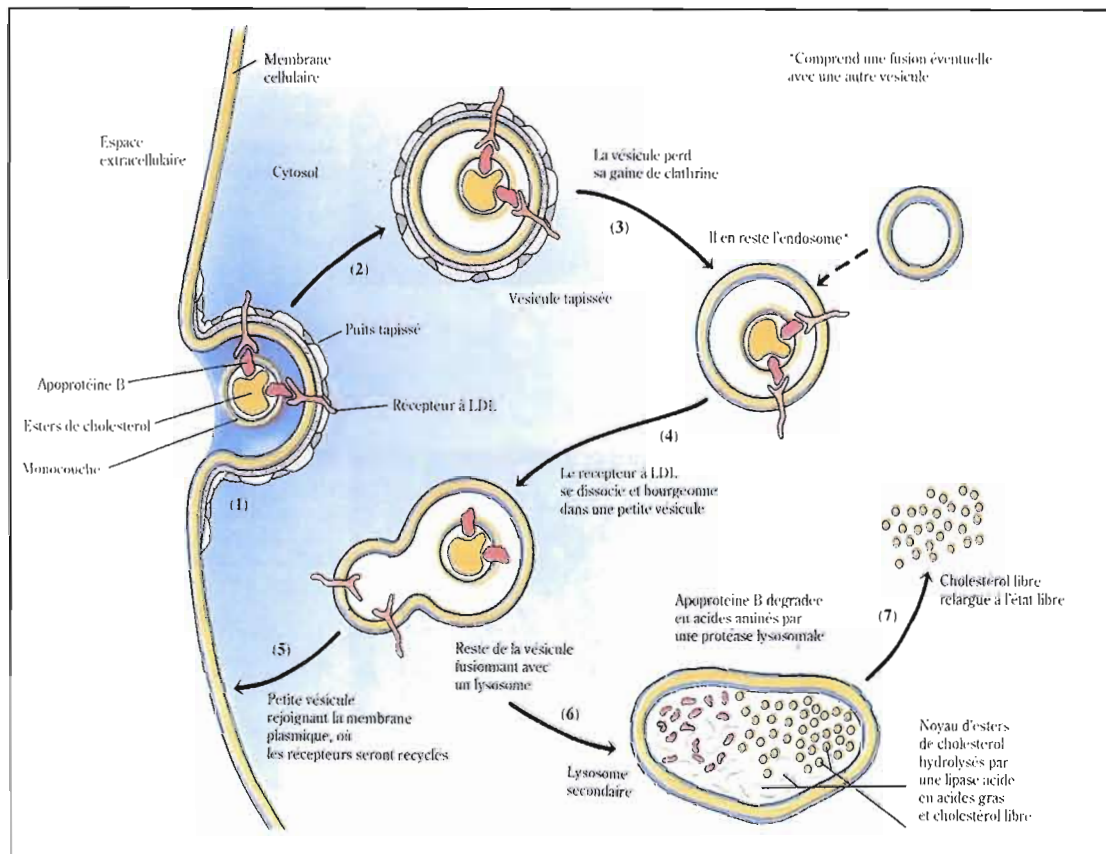


Figure 2: Endocytose des LDL par le rLDL. (1) Les LDL se fixent aux rLDL localisés dans les puits tapissés de clathrine. (2) Les LDL sont internalisées par endocytose. (3) La vésicule perd sa gaine de clathrine et devient un endosome. (4) Les rLDL se dissocient des LDL. (5) Les rLDL sont recyclés à la membrane plasmique. (6) Le reste de la vésicule contenant les LDL se fusionne avec un lysosome. (7) Les LDL sont dégradées en acides aminés et les molécules lipidiques sont hydrolysées. Le cholestérol libre est relâché pour des fins de régulation, de catabolisme ou de ré-estérification par l'ACAT. Dessin tiré de Rawn (1990).

Le maintien de l'homéostasie du cholestérol cellulaire a été démontré par le groupe de Brown et Goldstein avec la découverte des facteurs de transcription appelés "sterol regulatory element binding proteins" (SREBPs) (Yokoyama et al. 1993, Hua et al. 1993). Pour augmenter la transcription de l'HMG CoA réductase et du rLDL lorsque le niveau de

membranes du réticulum endoplasmique par deux clivages séquentiels protéolytiques (Sakai et al. 1998). Le premier nécessite la protéine SCAP ("SREBP cleavage-activating protein") (DeBose-Boyd et al. 1999) qui escorte les SREBP du réticulum endoplasmique au Golgi où les SREBPs sont clivés par la protéase site-1 (S1P) en deux moitiés (Rawson et al. 1998). Le second nécessite l'action d'une protéase site-2 (S2P) qui coupe les fragments intermédiaires (Rawson et al. 1997). Ainsi, le domaine N-terminal est transloqué dans le noyau où il lie les "sterol regulatory elements" (SREs) et ainsi contrôle la biosynthèse du cholestérol et l'entrée des LDL en activant l'expression des gènes de l'HMG CoA réductase et du rLDL.

### 1.3.2 Les récepteurs impliqués dans la voie de captation sélective

Le processus de captation sélective des EC des HDL est l'étape finale du transport inverse du cholestérol (voir section 1.4). Chez l'humain, la captation sélective des EC des LDL est considérée comme une voie permettant la clairance du cholestérol des LDL indépendante du rLDL. Or, plusieurs études suggèrent que certaines cellules peuvent retirer les EC des LDL et des HDL, sans toutefois entraîner une captation parallèle de leurs apolipoprotéines. La captation sélective est mise en évidence lorsque le ratio EC/apo des lipoprotéines associées aux cellules, après une incubation des cellules avec une lipoprotéine marquée radioactivement dans ses parties protéique (apo) et lipidique (CE), excède le ratio EC/apo de la lipoprotéine native (Leitersdorf et al. 1986).

La captation sélective des EC des HDL est un processus relativement bien connu. En effet, de nombreuses études ont permis d'établir que la captation sélective des EC des HDL se produisait dans une variété de tissus et de cellules en culture, et ce, chez plusieurs espèces: rongeur, lapin, bovin et humain (Glass et al. 1985, Arbeeny et al. 1987, Rinninger & Pittman, 1988, Rinninger & Greten 1990, Mackinnon et al. 1986, Wishart & Mackinnon 1990, Cherradi et al. 2001). Chez l'humain, la captation sélective des EC des HDL a été mise en évidence avec les fibroblastes (Rinninger & Pittman 1988, Pittman et al. 1987), les cellules HepG2 (Rinninger & Pittman 1988, Pittman et al. 1987, Brissette et al. 1999), les adipocytes (Fong & Angel 1989) et les hépatocytes en culture primaire (Rinninger et al. 1994).



En 1991, Green et Pittman (1991) ont obtenu *in vitro* et *in vivo* dans le foie perfusé des résultats suggérant la captation sélective des EC des LDL. Notre laboratoire a démontré en 1992 (Brissette & Falstraalt 1992) que les cellules HepG2 peuvent prendre sélectivement les EC des IDL. Ce fut la première évidence directe de la captation sélective d'une classe de lipoprotéines contenant de l'apoB par une cellule isolée. Au moment de cette dernière étude, le groupe de Madame Brissette avait attribué cette activité au site de liaison des lipoprotéines (SLL), mis préalablement en évidence sur des membranes de foie de rat par celle-ci en 1986 (Brissette & Noël 1986 et Brissette et al. 1986), car l'activité de la captation sélective des EC des LDL disparaissait lorsque des HDL étaient aussi ajoutées au milieu d'incubation. Or ceci était une caractéristique du SLL puisque ce dernier, contrairement au rLDL, avait aussi la capacité de lier les HDL (Brissette & Noël 1986). En 1996, Acton et al. (Acton et al. 1996) ayant démontré que le SR-BI était responsable de la captation sélective des EC des HDL, il devenait possible que le SLL soit en fait ce dernier. En effet, notre groupe a démontré que l'activité de captation sélective des EC des LDL ou de HDL de cellules hépatiques en culture primaire était perdue lorsque ces cellules provenaient de souris déficientes en SR-BI (Rhainds et al. 2003). Dans les sous-sections suivantes, nous allons donc décrire ce récepteur ainsi que le CD36 qui fait partie de la famille des récepteurs "scavengers" de classe B.

#### 1.3.2.1 Le récepteur "scavenger" de classe B, type I (SR-BI)

Le gène de SR-BI a été cloné simultanément chez l'humain à partir d'une génothèque d'ADNc de cellules HEL (cellules érythroleucémiques) (CLA-1: «CD36 and LimpII-analogous-1») (Calvo & Vega 1993) et chez le hamster à partir d'un mutant de cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO) (SR-BI) (Acton et al. 1994). Il existe 81% d'homologie dans la séquence en acides aminés entre le hamster et l'humain (Acton et al. 1994). Étant donné que les travaux sur le métabolisme du cholestérol ont été effectués majoritairement sur le SR-BI et qu'aucune terminologie définitive n'existe, nous avons opté pour l'emploi du terme SR-BI aussi pour la protéine d'origine humaine dans cette thèse de recherche. Le gène de SR-BI est situé sur le chromosome 12q24.2 chez l'humain (Cao et al. 1997) ou 12q24.31-32 (Johnson et al. 1998). Chez la souris et le rat, il est localisé sur le chromosome 5 (Welch et al. 1997) et 12q15-16 (Johnson et al. 1998), respectivement. Le produit du gène de SR-BI

chez l'humain et le rongeur est constitué de 509 acides aminés et a un poids moléculaire apparent de 57 kDa (Acton et al. 1994). La protéine est hautement glycosylée dans le domaine extracellulaire (Babitt et al. 1997) et possède un poids moléculaire de 82 à 88 kDa (Acton et al. 1996, Rigotti et al. 1995).

Le SR-BI est capable de lier avec haute affinité les LDLox et LDL-acétylées (LDLac), ce qui en fait par définition un récepteur "scavenger". À la grande surprise, ce récepteur, au contraire des récepteurs classifiés "scavengers", a démontré une haute affinité pour les LDL et HDL natives (Acton et al. 1996) ainsi que les VLDL (Calvo et al. 1997). Il lie également l'albumine de sérum bovin maléylée (M-BSA) (Acton et al. 1994), les apolipoprotéines (apoA-I, apoA-II, apoC-III, apoE) (Xu et al. 1997, Thuahnai et al. 2001), les phospholipides anioniques tels la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol et l'acide phosphatidique (Rigotti et al. 1995). Ces derniers se trouvent principalement dans les feuillettes internes de la membrane plasmique et sont mis à nu lors du processus d'apoptose. Ainsi, on peut croire qu'il aurait aussi un rôle dans la reconnaissance des cellules sénescents (Rigotti et al. 1995).

Ce récepteur est exprimé dans tous les tissus capables de capter sélectivement le EC des HDL, c'est-à-dire dans les tissus stéroïdogènes (testicules, ovaires, surrénales), et au niveau du foie chez la souris (Acton et al. 1994), le rat (Landschulz et al. 1996) et l'homme (Liu et al. 1997B). Il est également exprimé chez le hamster dans les tissus adipeux, les poumons et l'intestin (Acton et al. 1994). Aussi, on le retrouve au niveau des macrophages (Matveev et al. 1999), des cellules endothéliales (Goti et al. 2001), des cellules musculaires lisses (Yeh et al. 2002), de l'intestin (Cai et al. 2001), des kératinocytes (Tsuruoka et al. 2002) et des cellules épithéliales (Duncan et al. 2002). Par contraste avec les rongeurs, le SR-BI est exprimé fortement dans le placenta humain (Cao et al. 1997, Lafond et al. 1999).

Il se présente sous la forme d'un U inversé dont la majeure partie se trouve dans l'espace extracellulaire ancrée dans la membrane plasmique à chaque extrémité par un domaine transmembranaire (figure 3). La partie intracellulaire amino-terminale est très courte, comparée à la partie intracellulaire carboxy-terminale. La boucle extracellulaire contient de nombreuses cystéines, des sites de glycosylation et des sites d'acylations (ajout d'acides gras

comme le palmitate et myristate) (Babitt et al. 1997) en plus d'être impliquée dans le transport sélectif des lipides (Gu et al. 1998). La partie intracytoplasmique carboxy-terminale possède, pour une raison encore inconnue, une séquence de ciblage peroxysomale PTS1 ("peroxysomal targeting sequence") et un motif "leucine-zipper" (formation d'oligomères) (Johnson et al. 1998). Enfin, le domaine intracellulaire de SR-BI contient des sites potentiels de phosphorylation pour différentes protéines kinases susceptibles de contrôler son activité (Johnson et al. 1998).

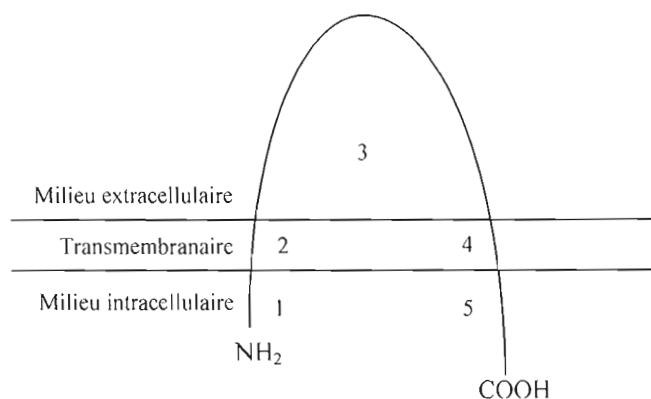


Figure 3: Structure schématisée de la protéine SR-BI. Il s'agit d'une protéine monomérique possédant 5 domaines dont une queue cytoplasmique N-terminale (acides aminés 1-8), un premier domaine transmembranaire (acides aminés 9-36), un long domaine extracellulaire (acides aminés 37-439), un second domaine transmembranaire (440-462) et une queue cytoplasmique C-terminale (acides aminés 463-509) (Calvo & Vega 1993).

En 1997, le groupe de Krieger (Babitt et al. 1997) a démontré par des techniques de fractionnement cellulaire et de microscopie par immunofluorescence que le SR-BI est localisé dans les cavéoles (ces structures seront décrites plus loin dans la section 1.4.2.2). Par fractionnement cellulaire, les résultats démontrent que le SR-BI co-purifie avec la cavéoline-1 dans les membranes enrichies en cavéolines dans les cellules IdIA (cellules CHO déficientes en rLDL) exprimant le SR-BI murin. Pareillement, la microscopie à immunofluorescence indique qu'une partie significative du SR-BI est colocalisée avec la cavéoline-1. De ce fait, les auteurs ont suggéré que le SR-BI est préférentiellement concentré dans les cavéoles. Une autre équipe a démontré que le SR-BI co-immunoprécipite avec la cavéoline-1 lorsqu'il est exprimé dans les cellules endothéliales (Uittenbogaard et al. 2000).

Enfin, Webb et al. (1998) ont obtenu des résultats similaires confirmant que le SR-BI et le SR-BII (une isoforme de SR-BI) sont conjointement localisés dans les cavéoles des cellules IdIA exprimant SR-BI ou SR-BII. Cependant, des études plus récentes suggèrent une relation inverse entre les compositions en SR-BI et cavéoline-1 dans le processus de captation sélective. Dans la première étude, on a démontré qu'une surexpression de la cavéoline-1 au niveau des hépatocytes de souris entraîne une diminution de la captation sélective des EC-HDL médiée par le SR-BI (Frank et al. 2001B). De plus, Matveev et al. (2001) rapportent que la cavéoline-1 affecte négativement la captation sélective des EC-HDL médiée par le SR-BI dans les cellules CHO.

La forme du SR-BII résulte d'un épissage alternatif d'un précurseur d'ARNm unique généré à partir du gène du SR-BI. Ce précurseur produit une protéine avec un domaine cytoplasmique plus court de 39 acides aminés que celui de SR-BI. L'ARNm du SR-BII est largement exprimé et compte pour plus de 30% des ARNm des différentes formes de SR-B dans les glandes surrénales de souris, 40% dans le foie, 60% dans le tissu adipeux et constitue la forme majeure dans les testicules avec 79% (Webb et al. 1997). L'expression protéique de SR-BII a été détectée dans le foie de souris, les testicules et les glandes surrénales (Webb et al. 1998). Selon cette même étude, cette disparité entre le taux d'ARNm et l'expression protéique est due à l'instabilité de SR-BII lors de la traduction. Ainsi, le SR-BII est exprimé dans les mêmes tissus que le SR-BI mais de façon moindre dû à l'instabilité de son ARNm (de Villiers & Smart 1999). Tout comme le SR-BI, le SR-BII lie les HDL avec la même affinité mais transfère les lipides avec une efficacité 4 fois moindre que le SR-BI (Webb et al. 1997). Les séquences peptidiques sont identiques pour les deux isoformes mais le SR-BII se distingue par l'absence de la séquence de ciblage peroxysomal ("peroxisomal targeting signal type 1": PTS1) (Johnson et al. 2003).

Il existe aussi d'autres protéines capables de moduler la captation sélective engendrée par le SR-BI. Il y a d'abord le "C-terminal linking and modulating protein" ou "PDZ-domain binding protein" (CLAMP/PDZK1), une protéine de 70 kDa retrouvée sur les membranes d'hépatocytes de rat et les cellules HepG2. Elle sert à maintenir SR-BI à la surface cellulaire (Silver 2002) et module le transport intracellulaire et le métabolisme des EC-HDL (Ikemoto

et al. 2000). L'expression de l'apoE est aussi un modulateur positif de la captation sélective des EC des LDL et HDL<sub>3</sub> (Swarnakar et al. 1998, Charpentier et al. 2000). Cependant, les études de notre laboratoire démontrent que dans les cultures primaires d'hépatocytes de souris déficientes en apoE, cette dernière n'a aucun rôle significatif dans la captation sélective des EC à partir des LDL ou HDL<sub>3</sub> (Auger et al. 2001). Il est toutefois possible qu'un niveau minimal d'apoE soit requis pour favoriser la captation sélective. Plus dernièrement, notre laboratoire a démontré que l'apoC-II et l'apoC-III endogènes ou exogènes peuvent inhiber la captation sélective des EC (Huard et al. 2005). Enfin, la LH qui est associée à la surface cellulaire à des protéoglycans a aussi un pouvoir d'augmenter la captation sélective des EC-HDL. Selon certains auteurs, cet effet pourrait être dépendant (Lambert et al. 1999) ou indépendant de SR-BI (Brundert et al. 2003).

L'expression de ce récepteur est capable de provoquer un échange bidirectionnel du cholestérol car il est impliqué dans la captation sélective des EC et du CL des HDL (Acton et al. 1996) et LDL (Stangl et al. 1998, Swarnakar et al. 1999) ainsi que dans l'efflux de CL cellulaire vers des accepteurs (décrit plus loin dans la section 1.4.3.1). Il est aussi impliqué dans la captation des TG (Greene et al. 2001) et de différents PL (Urban et al. 2000, Thuahnai et al. 2001). Cependant, la captation sélective médiée par SR-BI envers les HDL est majeure pour le cholestérol (CL et EC) puisqu'elle représente plus de 70% de la captation lipidique totale de HDL<sub>3</sub> humaines (Thuahnai et al. 2001). L'information n'est toujours pas disponible pour cette voie métabolique envers les LDL.

Plusieurs études indiquent que le SR-BI joue un rôle clé dans la captation sélective des EC-HDL au niveau des cellules stéroïdogéniques et dans le foie (Temel et al. 1997, Varban et al. 1998). Elle a aussi été décrite pour les lipoprotéines contenant de l'apoB comme les LDL. En effet, les travaux de Wang et al. (1998) rapportent qu'une surexpression de SR-BI au niveau du foie de souris réduit le contenu d'apoB, apoE et en EC des VLDL et LDL. De plus, les cellules COS-7 transfectées avec l'ADN complémentaire (ADNc) de SR-BI sont capables de prendre sélectivement les EC à partir des VLDL, LDL, LDLox, LDLac et HDL (Calvo et al. 1997). Une étude plus indirecte a démontré aussi que le SR-BI peut médier la captation sélective des EC-LDL. Ainsi, les cellules IdIA7 exprimant l'ADNc de SR-BI favorisent un

plus haut taux d'estérification de LDL-cholestérol en cholestéryl oléate que les cellules normales (Stangl et al. 1998). Enfin, notre groupe a rapporté que le SR-BI est responsable de 70-90% de la captation sélective des EC des LDL et HDL dans les cellules HepG2 et les cultures primaires de cellules hépatiques de souris (Rhainds et al. 2003). Plus récemment, notre groupe a rapporté que les souris déficientes en SR-BI démontrent une diminution de la captation sélective des EC-HDL de 80% et une inhibition complète pour la captation sélective des EC-LDL dans la première phase de clairance (Brodeur et al. 2005). Cependant, la deuxième phase est caractérisée par une accélération de la disparition d'EC chez les souris déficientes en SR-BI. Ainsi, ceci suggère que chez la souris, seul le SR-BI médie la captation sélective des EC à partir des HDL alors qu'il existe deux voies pour les LDL; une dépendante et une indépendante de SR-BI (Brodeur et al. 2005).

Il est bien connu que la captation des EC de HDL est bénéfique mais qu'en est-il de celle exercée sur les LDL? Il n'y aucune démonstration jusqu'à ce jour que la captation des EC-LDL soit favorable à l'humain. Il faut savoir que chez l'humain, il y a beaucoup plus de LDL que chez les rongeurs, donc il est important d'en savoir davantage sur l'effet physiologique de la captation sélective sur la physiologie et le métabolisme subséquent des LDL. Puisque les travaux de Brissette et al. (1996) ont démontré que lorsque les LDL sont incubées avec les cellules HepG2, elles deviennent significativement appauvries en EC de même que si elles sont injectées à des souris (Brodeur et al. 2005), on pourrait croire que ceci serait favorable physiologiquement car le cholestérol des LDL est un facteur de risque pour les MCV. Cependant, les études de Brodeur et al. (2005) ont aussi révélé que les LDL injectées à des souris deviennent appauvries en EC. Ainsi, si ces LDL appauvries en cholestérol sont des "small dense" LDL (LDL associées au phénotype B athérogène), l'effet de SR-BI serait néfaste car ces dernières LDL s'associent peu au rLDL et sont plus sensibles à l'oxydation (Chapman et al. 1998). Le groupe de Madame Brissette tente actuellement de solutionner cette énigme.

SR-BI possède aussi d'autres fonctions comme l'absorption intestinale du cholestérol (Werder et al. 2001), le développement des ovocytes et la fertilité des souris femelles (Trigatti et al. 1999A) ainsi que la suppression des cellules apoptotiques (Murao et al. 1997).

Afin de démontrer *in vivo* l'implication de SR-BI dans la voie de captation sélective des EC-HDL et dans le processus d'athérosclérose, plusieurs chercheurs ont eu recours aux modèles de souris transgéniques et déficientes. Trois types de souris ont été créés: les souris déficientes en SR-BI, les souris qui surexpriment le SR-BI ainsi que des souris exprimant des niveaux différents de ce récepteur dans des modèles de souris transgéniques et déficientes reliés au métabolisme de lipoprotéines (tableau IV). Le modèle de souris qui démontre une diminution de l'expression hépatique de SR-BI (Rigotti et al. 1997) illustre une augmentation de 31% de la concentration plasmatique des HDL, une hausse de la taille de ces HDL (riches en apoE et pauvres en apoA-II). Une autre étude a révélé que les souris ayant une expression du SR-BI atténuée par une mutation du promoteur démontrent une diminution de la captation d'EC-HDL au niveau du foie (Varban et al. 1998). Ainsi, tout laisse présager que le SR-BI joue un rôle important dans le transport réverse du cholestérol du moins chez la souris. De plus, les souris homozygotes déficientes en SR-BI (KO) démontrent une réduction du cholestérol biliaire et les souris femelles sont infertiles tandis que les doubles homozygotes déficientes en SR-BI et apoE ont davantage de lésions athérosclérotiques (Trigatti et al. 1999A) que les souris uniquement déficientes en apoE. Il est à noter que les souris déficientes en apoE constituent un bon modèle pour étudier l'athérosclérose. En l'an 2000, Huszar et al. (2000) ont croisé des souris déficientes en rLDL avec d'autres atténuées en SR-BI et ont observé une augmentation du cholestérol des LDL et une prédisposition à l'athérosclérose.

Inversement, la surexpression de SR-BI augmente l'entrée sélective des EC-HDL dans le foie et les surrénales (Wang et al. 1998), provoque une forte diminution de la concentration de cholestérol circulant lié aux HDL (Kozarsky et al. 2000) ainsi qu'aux VLDL et aux LDL (Arai et al. 1999, Kozarsky et al. 1997) et une augmentation du cholestérol biliaire (Kozarsky et al. 1997, Sehayek et al. 1998). Cette diminution de lipoprotéines athérogènes (VLDL et LDL) combinée à une réduction de 80% des lésions aortiques suggèrent que la surexpression de SR-BI peut avoir un puissant effet anti-athérogène.

Tableau IV: Modèles de souris transgéniques et déficientes (↓: diminution, ↑: augmentation)

Stratégie moléculaire	Expression hépatique de SR-BI	Entrée sélective des EC-HDL		Cholestérol plasmatique	Cholestérol biliaire	Autres
		Foie	Surrénales			
Hétérozygotes SR-BI +/- (Rigotti et al. 1997)	↓ 50%			↑ 31% HDL		
SR-BI KO (Rigotti et al. 1997, Trigatti et al. 1999A)	↓ 100%			↑ 125% HDL	↓	Femelles infertiles
SR-BI atténué (Varban et al. 1998)	↓ 53%	↓ 47%		↑ 50-70% HDL		
ApoE KO/SR-BI KO (Trigatti et al. 1999A)	↓ 100%			↑ VLDL, IDL/LDL	↓	↑ lésions athérosclérotiques
LDLr KO/SR-BI atténué (Huszar et al. 2000)	↓ 50%			↑ LDL et ApoB		↑ lésions athérosclérotiques
Ad-SR-BI (infection transitoire avec un adénovirus) (Kozarsky et al. 1997)	↑ 10X			↓ 85% (HDL)	↑ 2X	
SR-BI transgène (Wang et al. 1998)	↑ 12X	2X	5.6X	↓ 92% (HDL, VLDL, LDL)		
SR-BI transgène (Sehayek et al. 1998)	↑ 12X			-	↑ 1.4X	
Hétérozygotes LDLr +/- / SR-BI transgène (Arai et al. 1999)	↑ 10-40X			↓ VLDL, LDL, HDL	-	↓ 80% lésions athérosclérotiques
LDLr KO/SR-BI transgène (Arai et al. 1999)	↑ 10-40X			↓ LDL, HDL ↑ VLDL	-	Pas de différence dans les lésions athérosclérotiques
LDLr KO/Ad-SR-BI (transfection transitoire avec un adénovirus) (Kozarsky et al. 2000)	↑ 10X			↓ HDL		↓ lésions athérosclérotiques

### 1.3.2.2 Le "Cluster of differentiation 36" (CD36)

Le CD36 a d'abord été surnommé glycoprotéine IV en 1976 (Okumura & Jamieson 1976) puis cloné chez l'humain à partir des plaquettes par le groupe d'Oquendo et al. (1989). Endemann et al. (1993) ont par la suite cloné l'ADNc du gène CD36 à partir d'un modèle murin puis Abumrad et al. (1993) l'ont fait à partir d'adipocytes de rat. Ces derniers ont suggéré que ce récepteur appartient à la famille des protéines qui lient ou transportent les



acides gras à longues chaînes ("fatty acid transporter": FAT). Il existe 85% d'homologie dans la séquence en acides aminés de CD36 entre l'humain, la souris et le rat (Endemann et al. 1993, Abumrad et al. 1993).

Il s'agit d'une glycoprotéine de 78 à 88 kDa dont la forme non glycosylée est d'environ 50 kDa. Le CD36 possède une séquence comportant 471 acides aminés. Le gène est situé sur le chromosome 7q11.2 chez l'humain (Fernandez-Ruiz et al. 1993) et contient 15 exons (Armesilla & Vega 1994). Récemment, on a démontré que ce récepteur possède deux promoteurs alternatifs (Sato et al. 2002, Zingg et al. 2002). Cette protéine acylée possède 10 sites potentiels de glycosylation d'où sa résistance à la protéolyse. Le CD36 possède 5 domaines dont une queue cytoplasmique N-terminale (acides aminés 1-6), un premier domaine transmembranaire (acides aminés 7-34), un long domaine extracellulaire (acides aminés 35-439), un second domaine transmembranaire (440-466) et une queue cytoplasmique C-terminale (acides aminés 467-472) (Armesilla & Vega 1994). La partie extracytosolique possède un domaine associé à la membrane et peut former une poche hydrophobe pour la liaison aux différents ligands (Greenwalt et al. 1992). Son homologie avec le SR-BI est de 32,2% et la différence est plus significative dans la partie C-terminale, ce qui confère au CD36 un rôle fonctionnel unique (Calvo et al. 1995).

Une déficience en CD36 (maladie de Naka) est présente chez 2 à 3 % de la population japonaise et est souvent accompagnée de diabète, d'hypertriglycémie, d'hypertension et de MCV (Yamamoto et al. 1990). Aussi, une partie de la population africaine souffre d'une déficience en CD36 aux niveaux des plaquettes (Lee et al. 1999). Ainsi, nous pourrions penser que CD36 a un effet anti-athérogénique. Toutefois, les souris doublement déficientes en CD36 et apoE démontrent une augmentation de 76% des lésions aortiques par rapport aux souris uniquement déficientes en apoE, une altération dans le profil des lipoprotéines et la formation de cellules spumeuses (Febbraio et al. 2000). De plus, les souris homozygotes déficientes en CD36 ont une augmentation du taux de cholestérol plasmatique qui est due à un accroissement des niveaux de cholestérol et de phospholipides associés aux HDL, une augmentation de TG associés aux VLDL, une augmentation du niveau d'acides gras libres et une diminution de la glycémie à jeun (Febbraio et al. 1999). Ceci suggère que CD36 joue un

rôle clé comme médiateur d'athérosclérose (Febbraio et al. 2000) ainsi que dans le métabolisme des acides gras. De plus, une déficience en CD36 chez l'humain augmente le taux de cholestérol des LDL, ce qui suggère que CD36 a une contribution dans le catabolisme des LDL (Yanai et al. 2000). Ainsi, cette étude supporte les résultats *in vitro* que le CD36 est un récepteur de haute affinité pour les LDL natives (Calvo et al. 1998).

CD36 est exprimé dans une multitude de cellules et tissus comme les macrophages (Savill et al. 1992), les plaquettes (Lipsky et al. 1991), le placenta (Oquendo et al. 1989) et les adipocytes (Harmon & Abumrad 1993). Au niveau du foie humain, le CD36 est exprimé dans les hépatocytes et les cellules endothéliales. Dans les hépatomes humains (HepG2-A16), CD36 est exprimé sur les microvillosités de l'espace de Disse (Maeno et al. 1994). C'est un récepteur pour de multiples ligands. Il a un rôle dans l'athérosclérose et la phagocytose des cellules apoptotiques car on le considère à la fois comme un récepteur pour la thrombospondine (Silverstein & Nachman 1987), un récepteur de plaquettes pour le collagène (Tandon et al. 1989) et un récepteur pour les érythrocytes infectés au *Plasmodium falciparum* (parasite de la malaria) (Oquendo et al. 1989). Le CD36 joue aussi un rôle dans la transduction de signaux car il est associé avec les protéines de la tyrosine kinase (Src, Fyn, Yes et Lyn) (Huang et al. 1991). Également, il est impliqué dans la différenciation cellulaire des mégakaryocytes et des cellules hémopoïétiques (Greenwalt et al. 1992) ainsi que la formation des cellules spumeuses (Huh et al. 1996).

Le CD36 est aussi un récepteur "scavenger" car il est important dans le catabolisme des lipoprotéines en liant les LDLox et LDLac (Endemann et al. 1993), l'albumine de sérum bovin maléylée (Acton et al. 1994), les phospholipides anioniques exprimés sur les cellules apoptotiques (Ren et al. 1995) et les acides gras à chaîne longue (Glatz et al. 1997). Le CD36 lie les HDL avec une plus grande affinité que celle de SR-BI mais sa capacité à faire de la captation sélective des HDL est 7 fois plus faible que celle de SR-BI (Connelly et al. 1999). De plus, il apparaît qu'il peut aussi entraîner l'internalisation et la dégradation de ses ligands (Endemann et al. 1993). Au niveau des macrophages humains déficients en CD36, il a été démontré qu'il y a une baisse de 40% de la liaison, 30% de l'association et 25% de la dégradation des LDLox ainsi qu'une diminution de 50% de l'association des LDLac. Notre

groupe de recherche a démontré que 68% des EC des LDLox et 81% des EC des LDLac, deux ligands pour le CD36, sont hydrolysés dans les lysosomes des cellules HepG2 (Rhainds et al. 1999).

Les études du groupe de Lisanti et al. (Lisanti et al. 1994) ont démontré un enrichissement de CD36 au niveau des cavéoles. De plus, Chang et al. (Chang et al. 1994) ont purifié et caractérisé plus de 30 protéines associées aux cavéoles dont le CD36. En 1996, le groupe de Burns (Dorahy et al. 1996) a confirmé la présence du CD36 et de la tyrosine kinase (Src) dans les cavéoles et a démontré que leur association peut activer la signalisation des plaquettes. Ces faits suggèrent que le CD36, tout comme SR-BI, est situé dans les cavéoles (Matveev et al. 1999, Gu et al. 1998). Cependant, quelques études publiées dernièrement démontrent par la combinaison de microscopie électronique et d'essais biochimiques que CD36 est localisé dans les radeaux lipidiques ("lipid rafts") et non dans les cavéoles (Zeng et al. 2003). De plus, cette étude menée révèle que l'endocytose des LDLox médiée par CD36 nécessite les radeaux lipidiques et non la voie des cavéoles. Enfin, Ring et al. (2006) ont démontré que dans les fibroblastes embryonniques de souris normales, CD36 est logé dans les compartiments intracellulaires ainsi qu'à la membrane plasmique tandis que dans les souris déficientes en cavéoline-1, le récepteur est absent de la membrane plasmique. Ainsi, toutes ces études laissent présager que d'autres investigations sont nécessaires pour déterminer la localisation exacte de CD36.

#### 1.4 Transport inverse et efflux de cholestérol

Plusieurs études ont démontré une corrélation inverse entre le développement des MCV et le transport inverse du cholestérol, un processus par lequel les HDL soutirent l'excès de cholestérol des cellules périphériques et le ramène aux cellules du foie à des fins d'élimination. L'hypothèse du transport inverse du cholestérol date de 1968 et revient à John Glomset (1968) qui proposait que les HDL ont un rôle anti-athérogène. Depuis ce jour, cette hypothèse a été raffinée et on sait que ce processus suit 2 étapes, c'est-à-dire l'efflux du cholestérol extrahépatique suivi de l'influx de cholestérol au niveau du foie (figure 4). La première étape de ce transport est l'efflux de cholestérol, un processus par lequel le

première étape de ce transport est l'efflux de cholestérol, un processus par lequel le cholestérol libre est transloqué de la membrane plasmique vers des accepteurs extracellulaires tels les HDL ou les apolipoprotéines. Il existe plusieurs mécanismes pour faire l'efflux de cholestérol: la diffusion passive, la diffusion facilitée grâce à la cavéole/cavéoline, la diffusion facilitée grâce aux récepteurs SR-BI ou CD36 et finalement le transport actif médié par les protéines "ATP-binding cassette transporter" (ABCA1, ABCG1).

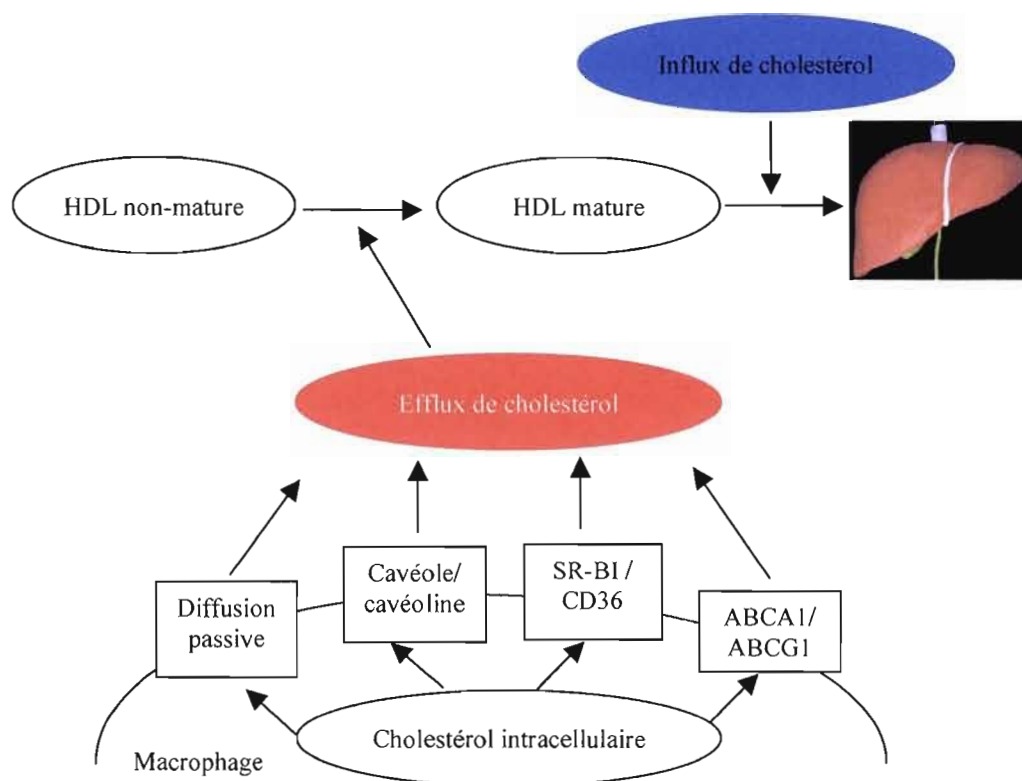


Figure 4: Transport inverse du cholestérol. Adapté d'Ohashi et al. (2005).

#### 1.4.1 Diffusion passive

La diffusion passive ou la diffusion aqueuse ne nécessite pas de compétition entre les solutés et ne requière pas l'action de récepteurs cellulaires, ni la présence d'adénosine triphosphate (ATP) (Kutchai 1993). Ce mécanisme implique une simple diffusion ou le cholestérol est transféré passivement selon un gradient de concentration de cholestérol. Lorsque les HDL

sont incubées avec les cellules, il y a présence d'un flux bidirectionnel entre les particules de HDL et la membrane plasmique.

Le taux d'efflux de cholestérol cellulaire par diffusion aqueuse est hautement dépendant de la structure des accepteurs (Rothblat et al. 1999). La taille de l'accepteur est importante car elle affecte les collisions médiées par la diffusion avec les molécules de cholestérol. La cyclodextrine, un oligosaccharide et accepteur non spécifique du cholestérol, peut générer rapidement l'efflux de cholestérol car elle diffuse à proximité de la membrane plasmique (Yancey et al. 1996). Tant qu'à l'albumine, elle peut aussi véhiculer le cholestérol des cellules aux lipoprotéines (Zhao et al. 1996).

#### 1.4.2 Diffusion facilitée par la cavéole/cavéoline

##### 1.4.2.1 Les microdomaines membranaires

Les cavéoles et les radeaux lipidiques (figure 5) sont organisés dans des régions discrètes de la membrane plasmique et possèdent des lipides et protéines similaires, à l'exception notable de deux composantes. Les radeaux lipidiques ne contiennent pas de cavéoline ni de protéines associées au GPI (glycosyl-phosphatidylinositol) (Brown & Waneck 1992, Smart et al. 1999). De plus, les radeaux lipidiques peuvent être isolés à partir de toutes les cellules, incluant celles qui expriment la cavéoline et celles qui ne l'expriment pas. Certains chercheurs considèrent que la cavéole est une sous-classe des radeaux lipidiques tandis que d'autres croient que ce sont deux domaines complètement séparés ayant des entités et fonctions distinctes. Les radeaux lipidiques sont des domaines spécialisés riches en cholestérol, en sphingolipides, en acides gras saturés ainsi qu'en protéines de transduction de signaux intracellulaires (Anderson 1998, Smart et al. 1999). Ce sont des structures de 10 à 200 nm, hétérogènes et hautement dynamiques (Pike 2006).

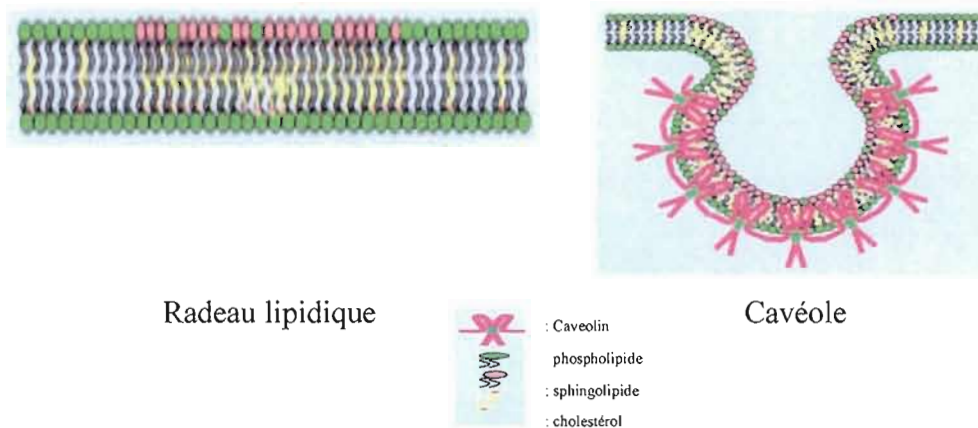


Figure 5: Radeau lipidique versus cavéole. Tiré de Razani et al. 2002C.

En 1953, George Palade (1953) a observé au niveau des cellules endothéliales des vésicules de plasmalemm qui permettent de transporter des molécules à travers l'endothélium vers d'autres compartiments. Deux ans plus tard, Eichi Yamada (1955) a donné le nom de cavéoles à ces structures. Ces dernières ressemblent à de petites caves, poches, vésicules ou fosses qui permettent aux cellules épithéliales une communication vers l'extérieur. D'abord, on a identifié le récepteur au folate dans les cavéoles (Rothberg et al. 1990) ainsi que la cavéoline, la première protéine intégrale des cavéoles (Rothberg et al. 1992).

#### 1.4.2.2 La cavéole

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique non-tapissées de clathrine et riches en cholestérol (4 à 30%) et sphingomyéline (jusqu'à 95%) (Brown & Rose 1992, Smart et al. 1995). Ces microdomaines spécialisés de la membrane plasmique mesurent de 50 à 100 nm et peuvent même atteindre 300 nm dépendant du contenu en cavéoline et cholestérol (Palade 1953, Yamada 1955). En effet, les quantités de cavéolines et de cholestérol sont très importantes dans le maintien des invaginations des cavéoles ainsi que dans l'internalisation des macromolécules. Les cavéoles sont ouvertes ou fermées à la surface cellulaire et par conséquent, ne sont pas limitées à la membrane plasmique (Anderson et al. 1998). Ce sont donc des membranes dynamiques qui changent de forme en réponse aux forces exercées. Contrairement aux invaginations tapissées de clathrine, elles sont résistantes aux concentrations de sels et pH élevés (Anderson et al. 1998). De plus, elles sont

caractérisées par une faible densité de flottaison (Smart et al. 1995) et une résistance à la solubilisation par le Triton X-100 à 4<sup>0</sup>C (Kurzchalia et al. 1992, Sargiacomo et al. 1993). Elles représentent de 5 à 20% du total de la surface de la membrane plasmique (Rothberg et al. 1992) et se retrouvent principalement dans les cellules endothéliales (5 000 à 10 000 cavéoles/cellule) (Peters et al. 1985), pneumocytes de type I du poumon, cellules épithéliales (Yamada 1955), cellules adipeuses (Scherer et al. 1994), cellules musculaires lisses et striées (Tang et al. 1996), fibroblastes (Rothberg et al. 1992) et cellules nerveuses (Ikezu et al. 1998). Vu l'abondance relative des cellules endothéliales et des pneumocytes de type I dans le poumon, c'est dans ce tissu qu'on retrouve le plus de cavéoles. Elles sont cependant peu présentes ou complètement absentes dans les lymphocytes (Fra et al. 1994) et les cellules transformées (Koleske et al. 1995). Les travaux de Fielding et Fielding (1997) ont démontré qu'il y a peu ou pas de cavéoles dans les cellules hépatiques et ces auteurs suggérèrent que les cavéoles sont absentes dans les cellules où la demande en cholestérol est élevée. Ceci a été confirmé chez le modèle hépatique humain, la cellule HepG2, par les expériences de Fujimoto et al. (2000) et Fu et al. (2004). Plusieurs molécules impliquées dans la transduction du signal ont été identifiées dans les cavéoles, suggérant que ces structures pourraient servir à compartimenter, moduler et intégrer les signaux moléculaires à la surface cellulaire. Les cavéoles sont enrichies de lipides, protéines acétylées, récepteurs membranaires, molécules de transduction de signaux, protéines associées au GPI et plusieurs autres dont la liste partielle est présente dans le tableau V.

Les cavéoles ont un rôle primordial dans le transport des macromolécules par endocytose (Okamoto 1998), transcytose (Schnitzer et al. 1994) ou par potocytose grâce à des canaux protéiques (Anderson et al. 1992). De ce fait, elles contribuent à la transduction de signaux dans les différents types cellulaires. De plus, elles permettent le maintien de l'homéostasie du cholestérol cellulaire, c'est-à-dire que le cholestérol *de novo* est transloqué aux cavéoles avant d'être diffusé dans toute la membrane plasmique (Smart et al. 1996).

Tableau V: Liste partielle des molécules présentes dans la cavéole. Tiré d'Anderson 1998.

Classe des molécules	Nom des molécules
Lipides	Ganglioside Sphingomyéline Céramide Diacylglycérol Cholestérol
Protéines acylées	Hétérotrimérique G <sub>α</sub> et G <sub>β</sub> Src, Fyn "Endothelial nitric oxide synthase" (e-NOS) Cavéoline
Protéines associées au GPI	Récepteur de folate Phosphatase alcaline Prion 5'-Nucléotidase CD14
Protéines prénylées	Rap1A Ras
Récepteurs membranaires	"Platelet-derived growth factor" (PDGF) Insuline "Epidermal growth factor" (EGF) Récepteur cholecystokinine (CCK) β adrénergique Bradykinine Endothéline SR-B1 CD36
Molécules de transduction de signal	PKCα GRB <sub>2</sub> MAP kinase Adényl cyclase PI3 kinase Raf1 Calmoduline
Transporteurs membranaires	Porine Récepteur inositol triphosphate (IP <sub>3</sub> ) Ca <sup>2+</sup> ATPase H <sup>+</sup> ATPase
Molécules structurales	Annexine II Myosine Actine
Autres	Peptides

Le trafic du cholestérol entre la cavéole et les membranes intracellulaires peut s'effectuer de deux façons. La première s'adresse principalement aux cellules endothéliales et nécessite des protéines de transport à leur surface comme les SNAPs et SNAREs (Schnitzer et al. 1995). Il y a invagination et la cavéole se détache de la membrane plasmique pour former un endosome et ensuite déverser son contenu. Dans ce cas, il y a internalisation entière de la lipoprotéine (Schnitzer et al. 1995) amorcée à la présence d'un complexe-chaperon de la



cavéoline contenant de l'annexine II (Uittenbogaard et al. 2002). L'association de l'annexine II à la cavéoline nécessite que cette dernière soit palmitoylée à la cystéine 133 pour l'internalisation des EC-HDL (Uittenbogaard et al. 2002). Une fois les EC acheminés au réticulum endoplasmique, le complexe est recyclé à la membrane pour recommencer de nouveau. En plus de faire la captation sélective des EC à partir des HDL, les cavéoles sont aussi le site de l'efflux du cholestérol. Fielding et Fielding (1995B) ont démontré que les pré- $\beta$ -HDL peuvent faire l'efflux du CL directement à partir des cavéoles. Plus récemment, Fu et al. (2004) ont démontré que la surexpression de la cavéoline-I dans les cellules HepG2 stimule l'efflux de cholestérol en rehaussant le transfert du cholestérol vers les cavéoles. Ce mécanisme avait été décrit antérieurement par Uittenbogaard & Smart (2000). Ainsi, le cholestérol s'associerait avec le complexe constitué de la cavéoline et des protéines HSP56, cyclophyline-A et cyclophyline-40. L'association entre le cholestérol et la cavéoline nécessite alors que cette dernière soit palmitoylée à la cystéine 143 et 156 et que le complexe lipide-protéine se déplace aux cavéoles par un mécanisme encore inconnu jusqu'à maintenant. De plus, la dynamine a été localisée au collet des cavéoles tout comme les invaginations tapissées de clathrine et qui grâce à son activité GTPase permet l'internalisation et le transport du cholestérol sous forme de vésicules (Oh et al. 1998).

Les cavéoles sont aussi des sites importants pour la transduction de signaux. Une des fonctions des cavéoles la mieux documentée et reliée au système cardiovasculaire est la régulation d'eNOS (Shaul 2003). Les souris déficientes en eNOS perdent leur tonus vasculaire et développent l'athérosclérose (Knowles et al. 2000, Kuhlencordt et al. 2001). L'enzyme eNos est normalement myristoylée et palmitoylée ce qui la cible aux cavéoles où elle réside sous forme inactive (Shaul 2002). L'exposition de cellules endothéliales aux LDLox diminue la teneur en cavéoline et en eNOS et par conséquent diminue la quantité de cholestérol dans les cavéoles, un événement précoce de l'athérogénèse (Engelman et al. 1998). De plus, Uittenbogaard et al. (2000) ont démontré que les LDLox se lient aux CD36 localisés dans les cavéoles des cellules endothéliales, ce qui mène à l'efflux de cholestérol. Plus récemment, des études ont révélé que l'activité de l'enzyme eNos peut être stimulée par la liaison des HDL aux SR-BI localisés dans les cavéoles des cellules endothéliales (Li et al. 2002, Mineo et al. 2003, Yuhanna et al. 2001).

La modification de l'expression des gènes des cavéolines a aussi été impliquée dans plusieurs pathologies telles que le cancer, le diabète, la maladie d'Alzheimer et la myopathie de Duchenne (Engelman et al. 1998).

#### 1.4.2.3 Les cavéolines

La cavéoline est la protéine majeure des cavéoles. Elle a été identifiée pour la première fois par Glenney et Zokas (1989) comme une protéine intégrale des cavéoles isolée pour la première fois dans les fibroblastes embryonnaires de sarcomes de poulet (Rothberg et al. 1992). En travaillant dans un aspect différent de la biologie, Kurzchalia et al. (1992) ont identifié une série de protéines insolubles au détergent 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) dans les cellules de mammifères. Une de celles-ci a été identifiée comme la protéine VIP-21 ("vesicular integral protein-21kDa"). Ce sont les travaux de Glenney (1992) qui démontrèrent que les séquences des protéines VIP-21 et cavéoline étaient identiques donc qu'il s'agissait de la même protéine. Il s'agit d'une protéine de 20 à 25 kDa (Glenney & Sopet 1992) qui est importante pour le maintien des cavéoles car son expression mène à la formation spontanée de cavéoles (Lipardi et al. 1998). En effet, plus de 90% de la cavéoline se retrouve associée aux cavéoles (Vogel et al. 1998). Elle a la capacité d'interagir avec elle-même ou avec les autres cavéolines pour former des homo-oligomères ou hétéro-oligomères de 200 à 400 kDa (Sargiacomo et al. 1995, Monier et al. 1995). Murata et al. (1995) ont démontré que la cavéoline peut lier directement le cholestérol avec une haute affinité (ratio de 1:1) et qu'elle est couplée à une PKC $\alpha$  (Tang et al. 1994). On dénombre 3 gènes différents dans la famille des cavéolines: la cavéoline-1 ou VIP-21, la cavéoline-2 et la cavéoline-3. Les cavéoline-1 et 2 se retrouvent sous plusieurs isoformes conservées entre espèces. Les différentes isoformes se ressemblent dans leur domaine hydrophobe qui permet l'ancrage de la protéine dans la membrane, tout en laissant les portions N- et C-terminales libres dans le cytoplasme (figure 6). Les cavéolines ont une similarité dans leurs structures et fonctions mais diffèrent au niveau des propriétés et distribution tissulaire (tableau VI). Les cavéoline-1 et -2 possèdent une distribution tissulaire similaire tandis que la cavéoline-3 est localisée spécifiquement dans les cellules musculaires et neurogliales. Leurs fonctions diffèrent dans l'interaction avec les protéines G. La

cavéoline-1 a la propriété d'inhiber la dissociation des GDP de la sous-unité  $\alpha$  et permet de maintenir les protéines G trimériques dans leur forme inactive (GDI: "GDP-dissociation inhibitor") (Li et al. 1995). En contraste, la cavéoline-2 stimule l'activité de la GTPase de la sous-unité  $G_{0\alpha}$  et par conséquent agit comme une protéine activant la GTPase (GAP: "GTPase-activating protein") (Scherer et al. 1996). Quant à la cavéoline-3, elle possède les deux propriétés d'action sur GDI et GAP (Tang et al. 1996).

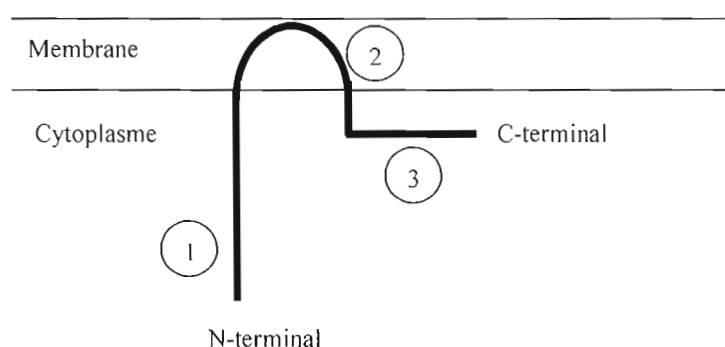


Figure 6: Domaines structuraux de la cavéoline-1

1-Domaine N-terminal (acides aminés 1-101): Domaine cytoplasmique qui est responsable de la formation des homo-oligomères (acides aminés 61-101), de la sortie du réticulum endoplasmique (acides aminés 66-70) et qui est caractérisé comme un domaine d'ancrage (acides aminés 82-101) pour l'interaction avec les molécules de signalisation cellulaire.

2-Domaine intramembranaire (acides aminés 102-134): Domaine intramembranaire putatif possédant 33 acides aminés hydrophobes.

3-Domaine C-terminal (acides aminés 135-178): Domaine situé dans le cytoplasme constitué de 44 acides aminés permettant le pont pour l'interaction entre les homo-oligomères. Trois résidus de cystéines sont palmitoylés (acides aminés 134, 144, 157).

Tableau VI: Cavéolines: nomenclature, tissus et propriétés

Nom	Chromosome	Tissus	Propriétés
Cavéoline-1 VIP-21	7q31.1	Adipocytes, endothéliales, fibroblastes	Activateur de la GDI
Cavéoline-2	7q31.2	Adipocytes, endothéliales, fibroblastes	Activateur de la GAP
Cavéoline-3 M-cavéoline	3p25	Spécifique au muscle: squelettique, cardiaque, et lisse	Activateur de la GDI et GAP

#### 1.4.2.3.1 Cavéoline-1 ou VIP21 (“Vesicular Integral Protein – 21 kDa”)

La cavéoline-1 a été clonée chez le poulet (Glenney & Sopet 1992) tandis que la protéine VIP21 a été identifiée chez le chien (Kurzchalia et al. 1992). Ces 2 protéines sont homologues et ne diffèrent que de 8 acides aminés. Le terme cavéoline a cependant dominé sur VIP21 dû à sa présence marquée dans le manteau des cavéoles. C’est une protéine de 20 à 24 kDa codée par 3 exons (figure 7A) hautement conservés entre espèces. Elle possède 2 isoformes dont la cavéoline-1 $\alpha$  qui est la forme complète de 178 acides aminés et la cavéoline-1 $\beta$  (32-178 acides aminés) qui est une forme tronquée dérivant d’un site d’initiation alternative pendant la traduction (Scherer et al. 1995, Kogo et Fujimoto 2000, Kogo et al. 2004) (figure 7B). La cavéoline-1 est présente à 90% au niveau de la surface cellulaire (majoritairement dans les cavéoles) et 10% au niveau du Golgi et du réticulum endoplasmique (Rothberg et al. 1992, Monier et al. 1995, Smart et al. 1994). Sa structure se distingue par 3 domaines et la figure 6 représente les domaines fonctionnels de la cavéoline-1.

Les cavéoline-1 et -3 (mais pas la cavéoline-2) sont palmitoylées sur trois cystéines dans la région C-terminale. Cependant, cette palmitoylation n’est pas nécessaire pour la formation de cavéoles mais stabilise la structure de la cavéoline-1 à la membrane (Dietzen et al. 1995). L’expression de la cavéoline-1 est corrélée avec la présence d’invagination de cavéoles (Fra et al. 1995, Smart et al. 1996) ainsi que la présence de striation (principalement dans les cellules endothéliales) (Peters et al. 1985). De plus, c’est une protéine qui lie le cholestérol pour la stabilisation des oligomères (Murata et al. 1995). La cavéoline-1 forme des homo-oligomères *in vitro* et *in vivo* (Monier et al. 1995) tandis que les cavéoline-1 et -2 forment entre elles des complexes hétéro-oligomères stables jusqu’à 350 kDa (Scherer et al. 1997). Ainsi, les stérols doivent travailler en concert pour former le manteau des cavéoles. D’autre part, la cavéoline-1 lie le cholestérol pour la régulation de l’influx (Uittenbogaard et al. 2000, 2002) ou l’efflux de cholestérol via des accepteurs comme les LDL (Everson & Smart 2001) ou HDL (Fielding & Fielding 2001).

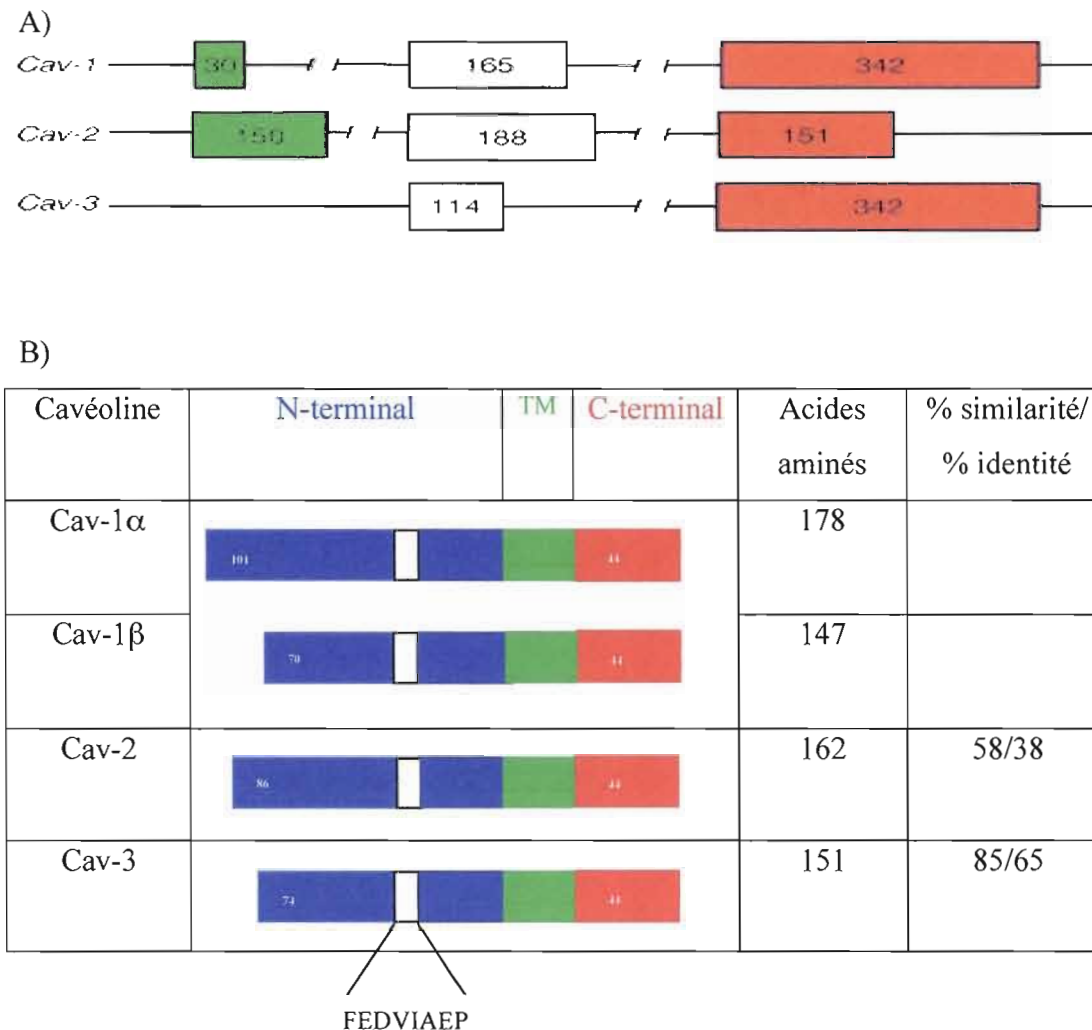


Figure 7: La famille des cavéolines. A) Arrangement des exons. Le nombre de nucléotides dans chaque exon est indiqué dans chaque boîte. B) Diagramme schématique des membres de la famille des cavéolines. Les quatre cavéolines possèdent une séquence invariable FEDVIAEP dans le domaine N-terminal. Adapté de Hnasko & Lisanti (2003). Le chiffre à l'intérieur des domaines correspond au nombre d'acides aminés. Le % de similarité tient compte d'un acide aminé qui aurait été remplacé par un autre de la même classe (en comparaison avec la cavéoline-1). TM: transmembranaire.

La cavéoline-1 est phosphorylée sur les sites de sérine/thréonine par une PKC $\alpha$  (Mineo et al. 1998) et sur les tyrosines par la c-src (Glennay & Soppet 1992) et probablement par d'autres tyrosines kinases (Li et al. 1996, Tiruppathi et al. 1997). Cependant, seulement la cavéoline-1 $\alpha$  subit une phosphorylation dans les cellules transformées NIH 3T3 même si la forme  $\beta$  est

bien exprimée dans ces cellules (Li et al. 1996). Plusieurs facteurs peuvent stimuler la phosphorylation des tyrosines de la cavéoline-1 comme l'insuline, les oxydants, le stress, la sulfonylurée et la transformation cellulaire (Mastick et al. 1995, Vepa et al. 1997, Volonte et al. 2001, Muller & Geisen 1996, Li et al. 1996).

L'association de la cavéoline-1 avec le cancer a été d'abord démontrée dans les fibroblastes de sarcomes transformés (Glennay 1989). Par la suite, le groupe de Lisanti (Koleske et al. 1995) a démontré une réduction de la cavéoline-1 et des cavéoles dans les cellules transformées NIH 3T3. Une réduction de la cavéoline-1 et des cavéoles peuvent mener à des cellules cancéreuses due à une perte d'inhibition de contact lors de la prolifération (Lee et al. 1998).

La génération de souris déficientes en cavéoline-1 a été simultanément réalisée par deux groupes de chercheurs (Razani et al. 2001A, Drab et al. 2001) qui rapportent une absence complète de cavéoles dans tous les tissus où normalement la cavéoline-1 est exprimée (cellules endothéliales et adipeuses). Cependant, même si les cellules du muscle strié (cellules cardiaques et squelettiques) n'expriment pas de cavéoline-1, la cavéoline-3 est toujours présente dans les cavéoles. De plus, les niveaux de la cavéoline-2 sont réduits à moins de 10% par rapport à ceux des souris contrôles sans toutefois changer le niveau de la transcription de la cavéoline-2. Ceci laisse croire que la cavéoline-2 est instable en absence de la cavéoline-1 et ainsi qu'elle est dégradée. Les souris Cav-1  $-/-$  ont un taux normal de HDL (Drab et al. 2001). Toutefois, elles présentent une dysfonction pulmonaire (Drab et al. 2001), une résistance à l'insuline (Razani et al. 2002A), une lactation prématurée (Park et al. 2001), une dysfonction urinaire (Woodman et al. 2004), une hypertrophie cardiaque associée à une augmentation d'eNOS (Cohen et al. 2003), un défaut dans la réponse des facteurs de croissance dû à l'angiogenèse (Woodman et al. 2003), une dérégulation de la transcytose de l'albumine (Schubert et al. 2001) et une diminution de la durée de vie (Park et al. 2003). Les souris doublement déficientes en cavéoline-1 et apoE ont un profil de lipoprotéines pro-athérosclérotique dont une augmentation de cholestérol plasmatique et de TG. Cependant, il y a une diminution de 70% de lésions athérosclérotiques dans l'aorte en plus d'une baisse de CD36 et de "vascular cell adhesion molecule-1" (VCAM-1) (Frank et al. 2004).

Chez l'homme, l'ARNm de la cavéoline-1 a été détecté en petite quantité dans un homogénat de foie (Glenney 1992) et au niveau des hépatocytes (Yokomori et al. 2003). Par immunohistochimie, la cavéoline-1 est exprimée faiblement dans les sinusoides des hépatocytes (Yokomori et al. 2003) mais son expression protéique est peu ou pas détectée par immunobuvardage (Yokomori et al. 2002, 2003).

#### 1.4.2.3.2 Cavéoline-2

Tout comme la cavéoline-1, la cavéoline-2 est exprimée d'une façon ubiquitaire. Elle a été identifiée grâce au microséquençage des domaines riches en cavéoline purifiés à partir de la membrane plasmique provenant d'adipocytes et possède trois isoformes :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (Scherer et al. 1996). La cavéoline-2 est codée à partir de trois exons et est une protéine de 162 acides aminés (figure 7A et 7B). La cavéoline-2 $\alpha$  est l'isoforme complète tandis que deux autres formes tronquées (cavéoline-2 $\beta$  et -2 $\gamma$ ) ont été identifiées par Kogo et al. (2002) mais demeurent à être caractérisées. C'est une protéine dont la séquence est 38% identique à celle de la cavéoline-1. Elle joue un rôle de protéine accessoire pour la cavéoline-1 (Scherer et al. 1997, Okamoto et al. 1998). Lorsqu'elle est exprimée seule, elle forme des monomères ou des dimères retenus dans l'appareil de Golgi et ainsi ne résulte pas à la formation de cavéoles (Engelman et al. 1997). La cavéoline-2 est différente de la cavéoline-1 au niveau de la distribution intracellulaire. On la retrouve principalement au niveau du Golgi tandis que la cavéoline-1 se retrouve à la surface cellulaire. Plusieurs groupes ont remarqué que l'expression de la cavéoline-1 permet à la cavéoline-2 de sortir du complexe golgien pour se rendre à la surface où se retrouve les cavéoles (Parolini et al. 1999, Mora et al. 1999). Le niveau d'expression de la cavéoline-2 est indépendant du stade cellulaire et n'a aucun rôle avec les molécules de transduction de signal contrairement aux cavéoline-1 et -3 (Smart et al. 1994). La phosphorylation de la cavéoline-2 sur les sérines 23 et 36 est nécessaire pour la formation des cavéoles dans les cellules du cancer de la prostate (Sowa et al. 2003). Finalement, les souris déficientes en cavéoline-2 sont viables et fertiles mais démontrent une dysfonction pulmonaire sévère sans toutefois détruire les invaginations cavéolaires (Razani et al. 2002B).

#### 1.4.2.3.3 Cavéoline-3 ou M-cavéoline

La cavéoline-3 a été identifiée à travers des recherches dans des banques de données ainsi que des analyses de génothèques d'ADNc pour les homologues du gène de la cavéoline-1. Contrairement aux deux autres cavéolines, la cavéoline-3 ou son synonyme M-cavéoline est exprimée dans les tissus musculaires (principalement dans les myocytes des cellules cardiaques, le tissu squelettique et le muscle lisse) (Song et al. 1996B, Razani et al. 2002C) et permet la différenciation des myoblastes squelettiques en culture (Way & Parton 1995). Elle a aussi été rapportée dans les astrocytes (Ikezu et al. 1998) et les cellules endothéliales du sinus (Uehara & Miyoshi 2002). Le gène de la cavéoline-3 est composé de deux exons codant pour une protéine de 151 acides aminés ayant 65% d'homologie avec la cavéoline-1 mais diffère beaucoup du gène la cavéoline-2 (figure 7A et 7B). Tout comme la cavéoline-1, elle forme des homo-oligomères de haut poids moléculaire, interagit spécifiquement avec une protéine G trimérique et est riche en résidus cystéine (Tang et al. 1996). Elle a été associée avec la dystrophie musculaire de Duchenne où on a observé chez les patients une augmentation de cavéoles et de la cavéoline-3 (Repetto et al. 1999) ainsi qu'une augmentation de la créatine kinase (Carbone et al. 2000). De plus, les souris transgéniques qui surexpriment la cavéoline-3 ont une fonction cardiaque altérée sans présenter d'hypertrophie du cœur (Aravamudan et al. 2003, Koga et al. 2003). D'autre part, les souris déficientes en cavéoline-3 sont aussi viables et fertiles et expriment normalement les cavéoline-1 et -2 dans les autres tissus (Galbiatia et al. 2001). Par contre, on note dans ces souris une dégénération du muscle (Hagiwara et al. 2000), une cardiomyopathie (Woodman et al. 2002) et une augmentation de dépôt de tissus adipeux (Park et al. 2002). Enfin, les souris doublement déficientes en cavéoline-1 et -3 sont toutes aussi viables et fertiles mais elles sont déficientes pour les trois cavéolines et ont une cardiomyopathie sévère (Park et al. 2002).

#### 1.4.3 Diffusion facilitée par SR-BI/BII ou CD36

##### 1.4.3.1 Rôle de SR-BI/BII dans l'efflux de cholestérol



Il a été démontré pour la première fois que la surexpression de SR-BI stimule l'efflux de cholestérol via les HDL (Ji et al. 1997) ou les phospholipides (Jian et al. 1998) dans les cellules CHO. Par la suite, plusieurs études se sont multipliées pour associer le SR-BI à l'efflux de cholestérol. Ji et al. (1997) ont démontré une corrélation directe entre l'expression de SR-BI de six différents types de cellules et le niveau d'efflux de cholestérol. Tant qu'à Stangl et al. (1998), ils ont démontré que les HDL sont meilleures que les LDL comme accepteurs de cholestérol pour faire l'efflux. Les études de de la Llera-Moya (1999) ont révélé une augmentation de 500% de l'efflux de cholestérol sans être corrélée à une hausse significative du niveau de la liaison aux HDL. Par contre, certaines études (Gu et al. 2000A, Thuahnai et al. 2004) affirment qu'à faible concentration de HDL, l'efflux est dépendant de la liaison des HDL tandis qu'à forte concentration de HDL, l'efflux est indépendant de la liaison au récepteur. De plus, l'efflux de cholestérol via SR-BI est associé à plusieurs sous-populations de HDL dépendant de leurs compositions en apolipoprotéines, de leurs contenus en lipide ou de leurs tailles (Asztalos et al. 2005). Finalement, les études de resécration des HDL médiée par SR-BI est accompagnée par un efflux de cholestérol sans toutefois être dépendant de SR-BI (Pagler et al. 2006). Ceci laisse présager qu'il existe d'autres récepteurs dans la voie d'efflux de cholestérol.

Pour sa part, SR-BII est aussi impliqué dans l'efflux de cholestérol. La surexpression de SR-BII dans les cellules CHO génère une augmentation de l'efflux de cholestérol par les HDL et ceci de la même intensité que les cellules surexprimant le SR-BI (Webb et al. 1998). Mulcahy et al. (2004) rapportent aussi que dans les cellules CHO, la surexpression de SR-BII stimule l'efflux de cholestérol par les HDL et dans une moindre mesure par l'apoA-I

#### 1.4.3.2 Rôle de CD36 dans l'efflux de cholestérol

Beaucoup moins d'information est disponible à propos du rôle de CD36 dans l'efflux de cholestérol. Tout d'abord, il a été démontré que la surexpression de CD36 dans les cellules de reins de singe (COS-7) entraîne une augmentation de 60% de l'efflux de cholestérol tout en ayant une hausse de 6 fois du niveau de liaison aux HDL (de la Llera-Moya et al. 1999). Par contre, Han et al. (1999) révèlent que l'expression de CD36 régule la concentration de

cholestérol tout en diminuant l'efflux de cholestérol ce qui suggère que ce récepteur est positivement corrélé à la formation de cellules spumeuses ainsi que des lésions athérosclérotiques. Plus récemment, Rubic & Lorenz (2006) ont rapporté qu'une diminution de CD36 dans les cellules THP-1 provoque une augmentation de l'efflux de cholestérol médié par la protéine "ATP-Binding Cassette A1" (ABCA1). Enfin, on a démontré que l'expression de SR-BI est plus efficace à promouvoir l'efflux de cholestérol que l'expression de CD36 dans les cellules *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*, cellules d'insectes) (Parathath et al. 2004).

#### 1.4.4 Transport actif médié par la protéine "ATP-Binding Cassette" (ABC)

Les protéines ABC forment la plus grande famille de protéines caractérisées à ce jour (2-5% du génome humain) (Higgins 1992, Broccardo et al. 1999) et sont reconnues comme des transporteurs primaires actifs, c'est-à-dire qu'elles lient des substrats qu'elles transportent à travers la membrane en utilisant l'ATP comme source d'énergie (Klein et al. 1999). Les substrats peuvent être des lipides, peptides, acides aminés, carbohydrates, vitamines, ions ou xénobiotiques (Decottignies & Goffeau 1997, Klein et al. 1999, Bauer et al. 1999). Les protéines ABC sont caractérisées par la présence de 2 régions cytoplasmiques hautement conservées («ATP-binding cassettes») constituées de 2 courts peptides de motifs «Walker A» (activité de synthase) et Walker B» (sites catalytiques) (Walker et al. 1982), 2 «nucleotide binding domain» (NBD), un motif signature (C) et 2 domaines transmembranaires (TM). Les transporteurs ABC sont présents dans la membrane plasmique, les peroxysomes, le réticulum endoplasmique, le complexe de Golgi, les mitochondries et les vésicules sécrétoires intracellulaires (Bauer et al. 1999).

La famille des protéines ABC comprend 51 membres répertoriés chez l'humain. Le comité de la nomenclature du gène humain sépare cette famille en 7 grandes sous-familles selon leurs séquences en acides aminés: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF et ABCG. Les 2 protéines les plus caractérisées dans l'efflux de cholestérol appartiennent à la sous-famille d'ABCA et ABCG soit ABCA1 et ABCG1 que nous allons maintenant décrire.

#### 1.4.4.1 La protéine ABCA1

Ce fut en 1994 que le groupe de Chimini (Luciani et al. 1994) a cloné l'ADNc de la protéine ABCA1 qui a longtemps été nommée la protéine ABC1. L'ADNc humain fut cloné chez l'humain en 1999 (Langmann et al. 1999) et la protéine fut renommée ABCA1 due à un grand groupe de transporteurs similaires. Depuis quelques années, plusieurs chercheurs ont porté leur attention sur la protéine ABCA1 car elle est reliée à un désordre génétique récessif autosomal rare associé aux HDL connu sous le nom de la maladie de Tangier. Cette maladie a été nommée d'après l'île de Tangier dans la baie de Chesapeake (Virginie, ÉU) où les 2 premiers cas ont été découverts par Fredrickson et collaborateurs en 1961 (Fredrickson et al. 1961, Fredrickson 1964). Le premier cas fut un garçon de 5 ans dont les amygdales étaient grosses et de couleur jaune-orangée. Par la suite, sa soeur fut diagnostiquée pour les mêmes anomalies. La maladie de Tangier est un désordre génétique récessif autosomal rare. Une forme plus courante soit le syndrome de déficience en HDL (FHD) provoque les mêmes symptômes que ceux répertoriés chez les hétérozygotes de la maladie de Tangier (Brooks-Wilson et al. 1999, Marcil et al. 1999a).

La majorité des hétérozygotes de la maladie de Tangier ainsi que les individus FHD n'ont pas de symptômes cliniques. Par contre, tous les homozygotes de la maladie de Tangier sont identifiés sur la base d'une anomalie des amygdales. Le tiers des patients adultes développent des symptômes de neuropathie. Dans les autres cas, la maladie de Tangier résulte en un excès d'esters de cholestérol qui se dépose dans plusieurs organes (principalement dans les cellules de Schwann, cellules musculaires lisses et fibroblastes) entraînant plusieurs anomalies comme la splénomégalie, l'hépatomégalie, la thrombopénie, la lymphadénopathie, l'anémie, la diarrhée et la maladie coronarienne (Assman et al. 1995). De plus, les homozygotes sont caractérisés par une absence de HDL et d'apoA-I, un faible taux de LDL (environ 40% de la normale) et un haut taux de TG (>300 mg/dl) (Assman et al. 1995).

Le locus de la maladie de Tangier est situé sur le même chromosome que le gène ABCA1 soit le chromosome 9q31 (Rust et al. 1998). Ainsi, les individus souffrant de la maladie de Tangier ont un défaut dans le gène ABCA1. Le gène de 149 kpb comprend 50 exons

(Santamarina-Fojo et al. 2000) et génère un polypeptide de 2261 acides aminés (Pullinger et al. 2000) avec un poids moléculaire de 220 à 240 kDa (Langmann et al. 1999). La protéine ABCA1, fortement glycosylée (Tanaka et al. 2001), est composée principalement de 2 cassettes ATP hautement conservées ayant 2 peptides de motifs Walker A et Walker B ainsi que 2 complexes transmembranaires (figure 8). Ces complexes transmembranaires sont liés par un segment hydrophobe (RD: «regulatory domain») et composés chacun de 6 segments transmembranaires (TM 1-6: exons 16 à 18 et TM 7-12 : exons 38 à 43). De plus, la protéine possède 2 "nucleotide binding domain" (NBD1: exons 20 à 24 et NBD2 : exons 43 à 48), une grande maille extracellulaire et une longue séquence amino-terminale (exons 1 à 14) (Broccardo et al. 1999). Le gène est hautement conservé entre espèces car la protéine ABCA1 humaine possède 94% d'homologie avec la protéine murine.

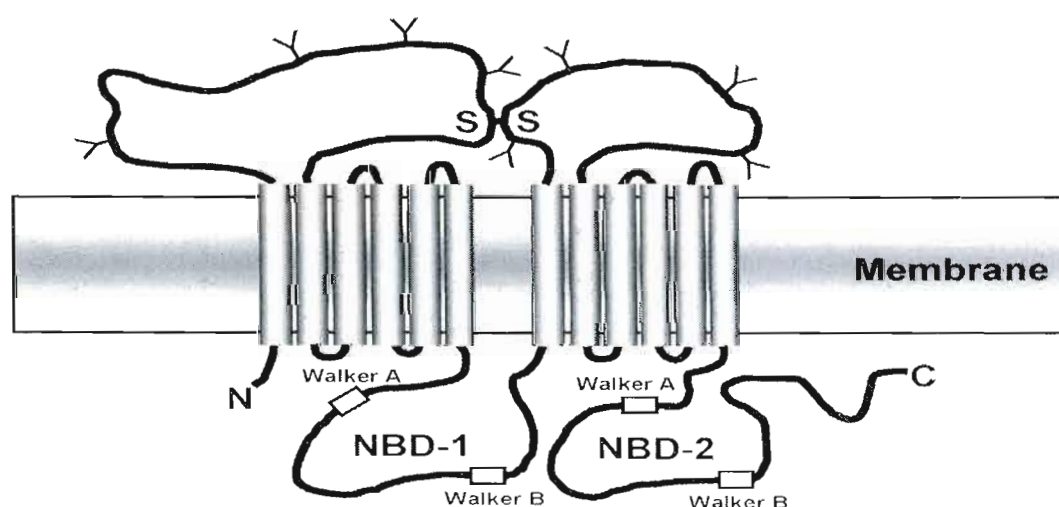


Figure 8: Structure de la protéine ABCA1. La protéine ABCA1 est composée de deux segments transmembranaires composés chacun de six segments transmembranaires, des peptides motifs (Walker A et B) et deux NBD («nucleotide binding domain»: NBD1 et NBD2). Tiré d'Oram 2003.

Le groupe de Chen et al. (2001) suggère que le cholestérol présent dans les compartiments endosomes tardifs/lysosomes est la source principale à partir de laquelle la protéine ABCA1 procède à l'efflux du cholestérol. Cependant, sa localisation exacte au niveau de la membrane plasmique est encore inconnue. Elle semble toutefois différente des invaginations riches en

cholestérol et sphingolipides (radeaux lipidiques) où des invaginations composées de cavéolines (cavéoles) (Mendez et al. 2000).

La protéine ABCA1 a un effet bénéfique car elle joue un rôle clé dans la modulation de l'homéostasie du cholestérol cellulaire. La protéine ABCA1 est impliquée dans l'efflux du cholestérol et des PL. Les études démontrent que les apoA-I et apoE ont les meilleures capacités pour entraîner cet efflux des lipides dont l'ABCA1 est responsable (Bortnick et al. 2000, Gillotte et al. 1999) mais une étude démontre que l'efflux du cholestérol médié par l'apoE endogène (sécrétée par la cellule) est indépendante de la protéine ABCA1 (Huang et al. 2001). Remaley et al. (2001) ont aussi démontré que la protéine ABCA1 peut médier l'efflux du cholestérol via plusieurs classes d'apolipoprotéines (apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoC-I, apoC-II, apoC-III et apoE) (Remaley et al. 2001). De plus, certains croient que la protéine ABCA1 a un rôle de récepteur à l'apoA-I, c'est-à-dire que l'apoA-I se lierait spécifiquement à la protéine ABCA1 à la surface cellulaire (Oram et al. 2000, Wang et al. 2000). Or, d'autres prétendent que c'est le résultat d'une interaction lipidique à proximité de la protéine ABCA1, c'est-à-dire que la présence de la protéine ABCA1 à la surface membranaire génère une modification de l'environnement lipidique permettant à l'apoA-I de soutirer les PL et par la suite de générer l'efflux du cholestérol (Chambenoit et al. 2001). Les études sur les fibroblastes des individus FHD et de ceux souffrant de la maladie de Tangier ont démontré un défaut dans le mécanisme de l'efflux des lipides et ce via des accepteurs différents (apoA-I et HDL) (Marcil et al. 1995, Marcil et al. 1999b, Rogler et al. 1995, Drobnik et al. 1999, van Dam et al. 2002, Brousseau et al. 2000). Les lignées cellulaires (fibroblastes humains atteints de la maladie de Tangier, cellules 293 contenant l'ADNc de la protéine ABCA1 murine, cellules RAW264 traitées à l'AMP cyclique) ont aussi permis de démontrer que la protéine ABCA1 a un rôle majeur dans l'efflux des lipides. Ainsi, la majorité des chercheurs admet que l'efflux du cholestérol médié par la protéine ABCA1 s'effectue principalement via l'apoA-I et les HDL (Wang et al. 2000, Lawn et al. 1999, Chen et al. 2000, Zheng et al. 2001), peu avec les HDL<sub>3</sub> et aucunement avec les HDL<sub>2</sub> (Wang et al. 2000, Wang et al. 2001).

#### 1.4.4.2 La protéine ABCG1

Les protéines ABCG ou la sous-famille "White" consistent en des protéines ABC de demi-tailles qui se dimérisent (figure 9). L'ADNc de la protéine ABCG1 a été indépendamment cloné par 2 groupes (Chen et al. 1996, Croop et al. 1997). Le gène de la drosophile est localisé sur le chromosome 21q22.3 (Bonne-Tamir et al. 1996). C'est seulement en 2000 qu'on a associé ABCG1 avec un rôle d'un régulateur du cholestérol au niveau des macrophages. En effet, cette étude démontre que la réduction de taux d'expression d'ABCG1 grâce à la stratégie d'anti-sens provoque une diminution de l'efflux de cholestérol via les HDL<sub>3</sub> (Klucken et al. 2000). En 2004, 2 groupes ont aussi démontré l'importance de ce transporteur dans l'efflux de cholestérol. Dans la première étude, les cellules HEK 293 transfectées avec l'ADNc de l'ABCG1 ainsi que celui de l'ABCG4, un autre membre de la famille ABCG, démontrent une augmentation d'efflux de cholestérol aux HDL<sub>3</sub> et HDL<sub>2</sub> mais pas à l'apoA-I; ceci sans toutefois mener à une augmentation appréciable de la liaison aux HDL (Wang et al. 2004). Dans la seconde étude, on a démontré dans les mêmes cellules que l'expression d'ABCG1 augmente l'efflux de cholestérol aux HDL<sub>3</sub> et HDL. Plus dernièrement, on a rapporté qu'une redistribution d'ABCG1 est associée avec une augmentation de l'efflux de cholestérol aux HDL ainsi qu'à la cyclodextrine, un accepteur non-spécifique (Wang et al. 2006). Maintenant, il est reconnu que l'efflux de cholestérol aux HDL requiert spécifiquement l'ABCG1 ou le SR-BI alors que l'efflux via l'apoA-I nécessite l'ABCA1 (Kennedy et al. 2005).

### 1.5 Le modèle de l'étude: le foie

#### 1.5.1 Le morphologie du foie

Le foie est le plus volumineux organe et le plus complexe représentant environ 2 à 5% du corps corporel humain. Il est situé sous le diaphragme et est enveloppé par la capsule de Glisson: une couche de tissu conjonctif dense. Le foie est multilobé chez la souris mais bilobé chez l'humain (lobe droit et gauche). Les lobes sont séparés par un ligament rond et falciforme, et de deux petits lobes secondaires (le lobe caudé et carré). Il reçoit une double

irrigation vasculaire soit via l'artère hépatique (transporte le sang oxygéné provenant de l'aorte, 25% du débit sanguin total) et via la veine hépatique (sang riche en nutriments et déchets provenant du tractus intestinal et de la rate, 75% du débit sanguin total) (Thomson & Shaffer 2000). Les lobes sont formés d'un grand nombre d'unités fonctionnelles, appelées lobules. Les lobules hépatiques sont de forme hexagonale et possèdent une organisation spéciale permettant de maximiser le contact entre les hépatocytes et le sang. Un lobule est composé de cellules épithéliales spécialisées qui sont des hépatocytes (cellules parenchymateuses). La circulation du sang dans le foie se fait dans les espaces tapissés d'un endothélium, les sinusoides qui sont, en partie, tapissés de cellules endothéliales et de cellules de Kupffer (cellules non parenchymateuses).

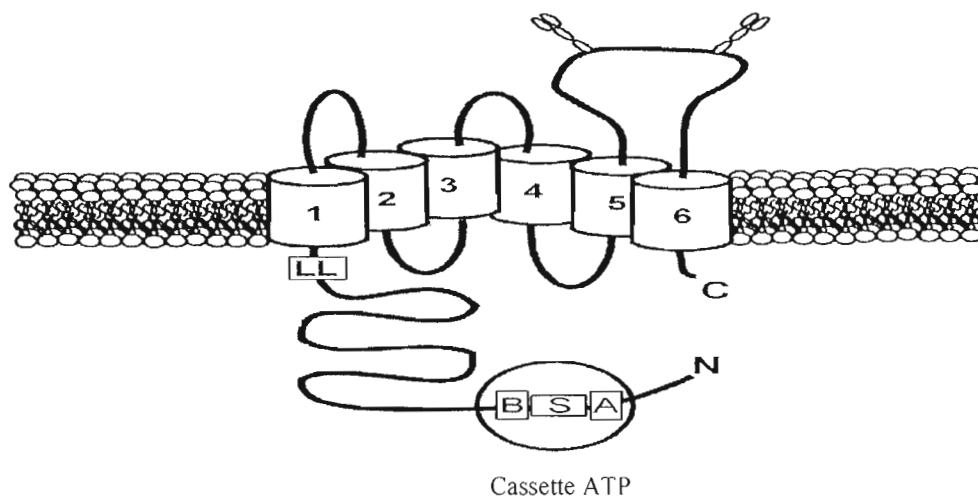


Figure 9: Structure de la protéine ABCG1. La protéine ABCG1 est composée d'un large domaine intracellulaire contenant une cassette ATP ayant deux peptides de motifs Walker A et Walker B ainsi que six domaines transmembranaires. Tiré de Schmitz et al. (2001).

## 1.5.2 Les types cellulaires hépatiques

### 1.5.2.1 Les cellules parenchymateuses

Les hépatocytes constituent la plus grande partie de l'organe. Ils sont disposés en plaques irrégulières, ramifiées et reliées entre elles autour d'une veine centrale. Ils représentent environ 60% des cellules totales du foie et occupent plus de 80% de son volume (Hendriks et

al. 1990). Les hépatocytes sont de grandes cellules polyédriques ayant un diamètre de 20 à 30  $\mu\text{m}$ . Le cytoplasme des hépatocytes est dense et composé de plusieurs organelles (réticulum endoplasmique, mitochondries, lysosomes, peroxyosomes, complexe de Golgi) et gouttelettes lipidiques. Les hépatocytes sont en majorité mononucléés avec un nucléole central dont le quart serait binucléés. Ils possèdent trois surfaces distinctes: apicale, basale et latérale. La surface apicale aligne le lumen entre les cellules adjacentes. La surface latérale assure la liaison des hépatocytes et la communication entre les cellules grâce aux jonctions gap. La surface basale fait face à l'espace de Disse et les hépatocytes forment de nombreuses microvillosités de formes irrégulières (Thomson & Shaffer 2000).

Les hépatocytes ont des fonctions multiples: la sécrétion des sels biliaires, le stockage des composés (hydrates de carbone, protéines, vitamines et lipides), la synthèse de molécules (protéine, glucose, acides gras, cholestérol, phospholipides), la détoxification et inactivation de composés endogènes (stéroïdes et autres hormones) (Zakim & Boyer 1990).

#### 1.5.2.2 Les cellules non-parenchymateuses

Les cellules non-parenchymateuses sont surtout représentées par les cellules endothéliales et les cellules de Kuppfer. Ces cellules constituent 40% des cellules totales du foie et accaparent seulement 6,5% de son volume (Hendriks et al. 1990).

Les cellules endothéliales, appelées aussi cellules endothéliales sinusoidales du foie, représentent 15 à 21% des cellules hépatiques (Daoust & Cantero 1959). Elles diffèrent des autres endothéliums vasculaires de l'organisme en ce qu'elles n'ont pas de membrane basale et sont fenêtrées, assurant aux hépatocytes un accès facile aux nutriments et aux macromolécules de plasma. Les cellules endothéliales participent aussi à l'endocytose de molécules et de particules ainsi que le métabolisme des lipoprotéines (Thomson & Shaffer 2000).

Les cellules de Kuppfer sont des macrophages tissulaires et représentent 9 à 14% de la population cellulaire hépatique. Ces cellules sont retrouvées dans le lumen sinusoidal et



quelquefois dans l'espace de Disse. Les cellules de Kupffer ont une forme irrégulière avec plusieurs extensions cytoplasmiques et contiennent un nombre important de lysosomes et de phagosomes. Elles sont considérées comme des membres phagocytaires du système réticulo-endothélial du foie. Parmi leurs principales fonctions se trouvent la phagocytose de particules étrangères, l'élimination d'endotoxines et d'autres substances nocives et la modulation de la réponse immunitaire par la libération de médiateurs et d'agents cytotoxiques (Thomson & Shaffer 2000).

### 1.5.3 Les fonctions du foie

#### 1.5.3.1 Métabolisme

Le foie joue un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides. Il stabilise les taux de glucose dans le sang en captant et en entreposant le glucose sous forme de glycogène (glycogénèse), en dégradant le glycogène en glucose (glycogénolyse), au besoin, ainsi qu'en formant du glucose à partir de substances non glucidiques telles que les acides aminés (gluconéogenèse). Le foie synthétise la majeure partie des protéines qui circulent dans le plasma, y compris l'albumine et la plupart des globulines autres que les gammaglobulines. Le foie est aussi le siège de la plus grande partie du catabolisme et des interconversions des acides aminés. Ces derniers y sont catabolisés en urée. Le foie capte les acides gras et les estérifie en triglycérides. Par un processus très complexe il lie les triglycérides avec le cholestérol, les phospholipides et une apolipoprotéine, ce qui donne une lipoprotéine. Celle-ci passe dans le sang où elle est utilisée ou mise en réserve dans les adipocytes. La synthèse du cholestérol se fait en majeure partie dans le foie. Les sels biliaires sont le principal produit du catabolisme hépatique (Thomson & Shaffer 2000).

#### 1.5.3.2 Métabolisation des drogues

Le foie est doté d'un système enzymatique très riche qui assure le métabolisme de nombreuses drogues, y compris l'alcool. Il détoxique les substances nocives qui arrivent de la circulation splanchnique et les empêche de passer dans la circulation générale. Cela rend le foie particulièrement vulnérable aux lésions d'origine médicamenteuse. Le foie convertit

certaines composés lipophiles en agents plus hydrophiles pour en faciliter l'excrétion dans l'urine ou la bile. Il en métabolise d'autres en agents moins actifs (Thomson & Shaffer 2000).

#### 1.5.3.3 Formation de la bile

La bile fournit la principale voie d'excrétion des métabolites toxiques, du cholestérol et des déchets lipidiques. Elle est aussi nécessaire à la digestion et à l'absorption efficace des graisses alimentaires. Les sels biliaires, synthétisés en exclusivité par le foie à partir du cholestérol, sont responsables de la formation de la bile. Après son excrétion par le foie, la bile est emmagasinée dans la vésicule biliaire durant les périodes de jeûne (Thomson & Shaffer 2000).

#### 1.6 Problématique, buts et hypothèses de travail

Depuis la découverte du rLDL en 1973, plusieurs chercheurs se sont hâtés de démontrer la présence d'autres récepteurs car il était connu que même en absence de ce récepteur, les LDL étaient catabolisées à un certain niveau et que de la captation sélective des EC se faisait à partir des HDL. En 1996, le SR-BI fut démontré comme étant le récepteur doté d'une activité de captation sélective envers les HDL. Au moment où mes travaux de doctorat ont été amorcés, notre groupe était particulièrement intéressé par ce récepteur ainsi qu'un membre de sa famille, le CD36, puisque ces deux récepteurs pouvaient aussi interagir avec des lipoprotéines natives, telles les LDL. Par la suite, certaines études ont démontré avec des cellules extrahépatiques que le SR-BI et le CD36 étaient impliqués dans le transport inverse du cholestérol, i.e. faire l'influx et l'efflux de cholestérol. Notre intérêt majeur était la cellule hépatique puisque le foie est le grand responsable du métabolisme des lipoprotéines. De plus, à l'époque, il était déjà connu que plusieurs différences existaient au niveau de métabolisme des lipoprotéines ou de la régulation de l'expression des gènes impliqués dans ce métabolisme entre les cellules hépatiques et extrahépatiques, ce qui nous poussaient à étudier d'une façon approfondie le rôle hépatique de ces récepteurs. À l'intérieur de cette problématique générale, nous avons choisi d'étudier l'impact de l'expression de la cavéoline-1, donc de la formation de cavéoles, sur l'activité de SR-BI et de CD36. Cette étude s'imposait car, au niveau des cellules extrahépatiques, ces deux récepteurs avaient été

démontrés dans des cavéoles. Or, ces structures étaient considérées absentes dans la cellule hépatique parenchymateuse (hépatocyte); une conséquence du très faible niveau d'expression de la cavéoline-1. L'hypothèse générale de mes travaux était que l'expression de la cavéoline-1 dans une cellule hépatique parenchymateuse modifierait l'activité de SR-BI et de CD36.

Dans le cadre des travaux réalisés pour cette thèse, nous avons utilisé deux modèles hépatiques, une particularité à notre groupe de recherche car peu d'études ont été faites sur ces modèles. Nous avons choisi un modèle humain de la cellule hépatique, l'hépatome immortalisé HepG2 (Forte & Nichols 1972). Ces cellules, en plus de cataboliser les lipoprotéines, les apolipoprotéines, le cholestérol et les acides biliaires, expriment tous les récepteurs pour notre étude. De nombreuses études démontrent que ce type de cellules constitue un modèle idéal pour l'étude des fonctions hépatiques et du métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines au niveau du foie chez l'humain (Forte & Nichols 1972, Dixon & Ginsberg 1993). Ainsi, des transformants stables exprimant la cavéoline-1, le SR-BI et le CD36 ainsi que ceux exprimant doublement la cavéoline-1 et le SR-BI ou le CD36 sont décrits dans les chapitres 2 et 3. Les cellules hépatiques (parenchymateuses ou non-parenchymateuses) de souris en culture primaire ont été obtenues par la perfusion de foie de souris à la collagénase, une technique que j'ai adaptée pour la souris. Ce modèle nous a permis d'étudier les cellules hépatiques de souris normales, déficientes en SR-BI (Rigotti et al. 1997), déficientes en CD36 (Febbraio et al. 1999) ou doublement déficientes en SR-BI et CD36 (voir chapitre 4). L'originalité de ces modèles animaux est lié au fait qu'ils sont complètement déficients dans le(s) récepteur(s) ciblé(s). Ainsi, nous avons pu étudier le rôle réel de chaque récepteur.

Le but de nos premiers travaux était d'étudier la captation sélective des EC à partir des lipoprotéines natives et modifiées dans les différents types de cellules hépatiques (cellules parenchymateuses et non-parenchymateuses). Notre intérêt à séparer les deux types cellulaires hépatiques était d'évaluer leur niveau d'expression des récepteurs importants dans la captation sélective. De plus, comme il était connu que les cellules de Kupffer de rat expriment beaucoup plus de cavéoline-1 que les hépatocytes de rat, il devenait aussi

intéressant d'analyser l'activité de captation sélective des récepteurs de la souris dans ce contexte, de même que l'efflux de cholestérol. Pour ce faire, nous avons isolé les cellules parenchymateuses et non-parenchymateuses à partir du foie de souris normales. Notre hypothèse de travail était que tous les types de cellules hépatiques seraient capables de faire de la captation sélective des EC à partir des différentes classes de lipoprotéines ainsi que de l'efflux vers les HDL puisque nous anticipions, tout comme chez le rat, l'expression de SR-BI et de CD36. Toutefois, nous pressentions que ces activités se présenteraient à des niveaux différents selon les degrés d'expression de la cavéoline-1 de chaque type cellulaire.

Dans un second lieu, notre étude visait à éclaircir l'implication des cavéoles synthétisées par des cellules d'origine hépatique dans le métabolisme des LDL et HDL. Notre modèle de cellules HepG2 exprimant la cavéoline-1 devait nous permettre de comparer notre système cellulaire hépatique avec le système extrahépatique déjà connu. Notre hypothèse était que l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules HepG2 entraînerait une colocalisation de la cavéoline-1 avec le SR-BI et de la cavéoline-1 avec le CD36, donc provoquerait un mouvement de ces récepteurs vers un nouveau microdomaine de la membrane, celui des cavéoles, et ainsi l'activité de ces récepteurs serait modifiée.

Dans un troisième temps, comme le foie génère une quantité substantielle de cholestérol, nous avons étudié l'efflux de cholestérol sur de multiples lignées de cellules HepG2 (surexprimant SR-BI, CD36, cavéoline-1, SR-BI et cavéoline-1 ou CD36 et cavéoline-1) ainsi que les cellules hépatiques de foie de souris déficientes (SR-BI, CD36 ou doublement déficientes en SR-BI et CD36). Notre hypothèse était que l'expression de ces protéines au niveau hépatique contribuerait positivement au phénomène d'efflux de cholestérol tout comme cela avait été démontré dans les cellules extrahépatiques. De plus, l'expression de la cavéoline-1 pourrait avoir un effet additif sur les récepteurs pour faire l'efflux de cholestérol.

Enfin, nos derniers travaux visaient à étudier l'effet de l'expression de la cavéoline-1 dans le métabolisme des LDLox dans les cellules hépatiques. Puisque notre groupe avait déjà démontré que le SR-BI était capable de médier la captation sélective des EC à partir des LDLox, notre hypothèse était que l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules hépatiques

favoriserait aussi cette voie. Notre hypothèse était basée sur le fait que l'expression de la cavéoline-1 pouvait moduler l'activité du SR-BI et ainsi jouer un rôle dans l'épuration des LDLox.

CHAPITRE 2:

Differential Abilities of Mouse Liver Parenchymal and Nonparenchymal Cells  
Towards HDL and LDL (Native and Oxidized) Association and Cholesterol Efflux

Biochem. Cell Biol. Avril 2006, 84(2): 250-256.

Differential abilities of mouse liver parenchymal and nonparenchymal cells towards HDL  
and LDL (native and oxidized) association and cholesterol efflux

Jany Lapointe, To Quyen Truong, Louise Falstrault and Louise Brissette<sup>1</sup>

Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec,  
Canada, H3C 3P8

<sup>1</sup>Corresponding author:

Louise Brissette, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal,  
C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

Tel: (514) 987-3000 ext. 6592

Fax: (514) 987-4647

E-mail: brissette.louise@uqam.ca

†This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and Quebec Heart Foundation attributed to L.B. L.B. was the recipient of a senior scientist scholarship from “Fonds de la recherche en santé du Québec” (FRSQ). T.Q.T. was the recipient of scholarships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the “Fonds pour la formation des chercheurs et l’aide à la recherche” (FCAR).

Short title: Hepatic cells abilities in cholesterol influx and efflux

## ABSTRACT

The aim of this study was to quantify the abilities of mouse liver parenchymal and nonparenchymal cells in low density lipoproteins (LDL), oxidized LDL (OxLDL) and high density lipoprotein (HDL)-cholesteryl esters (CE) selective uptake and in their free cholesterol efflux to HDL. The preparations of cells were incubated with lipoproteins labelled either in protein with iodine-125 or in CE with <sup>3</sup>H-cholesterol oleate and lipoprotein-protein and lipoprotein-CE associations were measured. The associations of LDL-protein and -CE with parenchymal cells are 5 and 2-fold greater, respectively than with nonparenchymal cells. However, in terms of CE-selective uptake (CE association minus protein association) both types of cells are equivalent. Similar results were obtained with OxLDL but both types of cells show higher abilities in OxLDL-CE than in LDL-CE selective uptake (in average by 3.4 fold). The association of HDL-protein with nonparenchymal cells is thrice that with parenchymal cells; however nonparenchymal cells associate 45% less HDL-CE. In contrary to parenchymal cells, nonparenchymal cells do not show HDL-CE selective uptake activity. Thus parenchymal cells selectively take CE from the three types of lipoproteins, while nonparenchymal cells exert this function only on LDL and OxLDL. Efflux is 3.5 fold more important in nonparenchymal than in parenchymal cells.



## INTRODUCTION

The liver is responsible for the major part of LDL and HDL metabolism. Both lipoproteins can follow two catabolic pathways. The first one involves endocytic internalisation and complete degradation (holoparticle uptake), the other one leads to the selective uptake of CE from the lipoprotein. LDL-receptor (LDLr) is the holoparticle receptor for LDL (for a review see Goldstein *et al.*, 1985). The identity of the hepatic receptor involved with HDL endocytosis/degradation is not defined yet. The scavenger receptor class B type I (SR-BI) (Acton *et al.*, 1994) is abundant in liver (Landschulz *et al.*, 1996) and binds native and modified lipoproteins such as OxLDL and mediates selective uptake of CE from both HDL (Acton *et al.*, 1996) and LDL (Swarnakar *et al.*, 1999). We have recently shown that SR-BI is responsible for more than 80% of CE selective uptake from LDL and HDL in primary cultures of mouse hepatic cells (total fraction) and in the HepG2 cell, a human hepatic parenchymal cell line (Rhains *et al.* 2003). SR-BI was also shown to favour free cholesterol efflux from cells (Gu *et al.* 2000A). Cholesterol efflux is a process by which peripheral cells remove and deliver excess cholesterol to liver for secretion into bile or conversion into bile acids (Ji *et al.* 1997).

LDL can be found oxidized in the blood and in fatty streaks. These OxLDL are unable to interact with LDLr but have the ability to interact with scavenger receptors. We have also showed in the past that in HepG2 cells a non-defined member of the SR-B protein family mediates CE selective uptake from OxLDL (Rhains *et al.* 1999). The cluster of differentiation-36 (CD36) (Oquendo *et al.* 1989) is also a SR-B family member that binds LDL, OxLDL and HDL and which is expressed in hepatic cell (Maeno *et al.* 1994). Comparative studies of CD36 and SR-BI functions revealed that CD36 mediates selective uptake of HDL-CE, albeit its >5-fold reduction in efficiency (Gu *et al.* 1998; Connelly *et al.* 1999). We found no evidence for a CD36 implication in LDL-CE selective uptake in HepG2 cells (Rhains *et al.* 2003), but its ability towards OxLDL-CE selective uptake is unknown.

Liver is constituted of various sub-types of cells of which hepatocytes (parenchymal cells) represent approximately 80% of the cell population. Endothelial and Kupffer cells account

for 14 and 8% of the liver cells, respectively (Daoust and Cantero, 1959). In the past, some studies were conducted to determine the ability of these sub-types of cells to selectively take CE from HDL. Fluiter *et al.* (1998) showed that rat parenchymal cells have such activity but not Kupffer cells. This study did not address the CE selective uptake from LDL and OxLDL. More recently Malerod *et al.* (2002) showed that SR-BI protein and CD36 mRNA are detectable in the three subtypes of rat hepatic cells, while caveolin-1, the main component of caveolae (Glenny and Zokas 1989; Rothberg *et al.* 1992), is only expressed by endothelial and Kupffer cells. This raises an important issue as SR-BI was shown to be concentrated in caveolae in Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing murine SR-BI (Babitt *et al.* 1997) and its localization in caveolae was suggested to be linked to its activity (Graf *et al.* 1999). Additionally, it has been demonstrated that caveolae and caveolin-1 can mediate cellular cholesterol efflux to plasma (Fielding and Fielding 1995A).

Our aim was to quantify the CE selective uptake activity of murine parenchymal and nonparenchymal hepatic cells towards native (LDL and HDL) and modified lipoproteins (OxLDL) and their cholesterol efflux to HDL. The mouse model was chosen, as it constitutes nowadays a frequently used rodent model for its many available transgenic and knockout mice. We found that parenchymal cells can selectively take CE from the three types of lipoproteins, while nonparenchymal cells exert this function only on LDL and OxLDL and that efflux is 3.5 fold more important in nonparenchymal than in parenchymal cells.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Materials*

CD1 male mice were from Charles River (Saint-Constant, Québec). Newborn calf serum and gentamycin were purchased from Life Technologies (Burlington, Ontario). 1,2-[<sup>3</sup>H]-cholesteryl ether oleate (50 mCi/mmol) was bought from Amersham Pharmacia Biotech (Laval, Quebec), [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-cholesterol (40-60 Ci/mmol) and <sup>125</sup>Iodine (as sodium iodide, 100 mCi/mmol) were from ICN Canada (Montreal, Quebec). Anti-SR-BI and anti-LDLr antibodies were obtained from Novus Biologicals (Littleton, CO), anti-CD36 rabbit polyclonal antibodies were from Research Diagnostics (Flanders, NJ). Rabbit IgG anti-caveolin-1 (polyclonal antibody-pAb C13630) was from BD-Transduction Laboratories, (Mississauga, Ontario). Enhanced chemiluminescence substrate and Complete protease inhibitor cocktail tablets were from Roche Diagnostics (Laval, Quebec). Goat anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase was from Chemicon (Temecula, CA).

### *Preparation, modification and labelling of lipoproteins*

Lipoproteins were isolated from human plasma obtained from Royal Victoria Hospital, (Montreal, Que.). Before the isolation, the plasma was adjusted to 0.01% ethylenediamine tetraacetate (EDTA), 0.02% sodium azide, 10  $\mu$ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 10  $\mu$ M Trolox. Human LDL (d = 1.025-1.063 g/ml), and HDL<sub>3</sub> (density 1.125-1.21 g/ml) were prepared as in Brissette *et al.* (1996). Standardly oxidized LDL (OxLDL) were prepared with 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> as in (Lougheed and Steinbrecher 1996) and characterized as in Rhainds *et al.* (1999). Oxidation was conducted after the radioiodination of proteins (<sup>125</sup>I). LDL and HDL<sub>3</sub> were iodinated by a modification (Langer *et al.* 1972) of the iodine monochloride method of McFarlane (1948). One mCi of sodium <sup>125</sup>iodide was used to iodinate 2.5 mg of LDL or HDL<sub>3</sub> in the presence of 30 nmoles (10 nmoles for HDL<sub>3</sub>) of iodine monochloride in 0.5 M glycine-NaOH, pH 10. Free iodine was removed by gel filtration on Sephadex G-25 followed by dialysis in Tris-buffered saline (TBS). The specific radioactivity ranged from 100,000 to 250,000 cpm/ $\mu$ g protein. LDL and HDL<sub>3</sub> were labelled with <sup>3</sup>H cholesteryl oleate essentially as described by Roberts *et al.* (1985). Thereafter the

labelled lipoproteins were re-isolated by ultracentrifugation. The specific activity of lipoproteins labelled in CE ranged from 6,800 to 11,900 cpm/ $\mu$ g protein.

#### *Preparation and primary cultures of mouse hepatocytes*

Hepatic cells were isolated from mouse liver as described by us (Truong *et al.* 2000). Briefly, the portal vein was cannulated with a 23-gauge plastic cannula. First, the liver was perfused with calcium-free Hank's balanced salt solution (HBSS) pH 7.4, pregassed with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, at a flow rate of 5 ml/minute. Subsequently, the liver was perfused with a collagenase solution (25 mg collagenase/100 ml HBSS containing 5 mM calcium) for 7 minutes. Hepatic cells were gently released from the Glisson capsule and isolated hepatic cells were maintained in Williams' E medium (WME) containing 10% newborn calf serum and 0.5% gentamycin. Viability of hepatic cells was assessed by trypan blue exclusion immediately after isolation and was >85%. Differential centrifugations were used to separate parenchymal (hepatocytes) from nonparenchymal liver cells (endothelial and Kupffer cells). Parenchymal liver cells from total cells were sedimented by centrifugation for 5 min at 50 g and the pellet was washed 3 times in WME. The supernatants were centrifuged twice (5 min at 50 g) to eliminate remaining hepatocytes and nonparenchymal liver cells were sedimented by centrifugation for 10 min at 220 g. Finally, nonparenchymal cells were washed thrice in WME. Cells were plated in 12-well plastic dishes, precoated with collagen (3  $\mu$ g/ml), at  $0.8 \times 10^6$  viable cells per well in 1 ml of culture medium. After a 3-hour adherence period, nonviable cells were removed from the cultures by careful washing. The serum-containing medium was then replaced by MEM. They rapidly formed monolayers under these conditions. Primary cultures of hepatic cells were used in assays after an overnight culture in MEM.

#### *SR-BI, LDLr, CD36 and caveolin-1 immunoblotting*

Total cell proteins from either mouse hepatic parenchymal or nonparenchymal cells were extracted by Triton X-100 1.4% solubilization (Yoshimura *et al.* 1987). Proteins (25-50  $\mu$ g) were separated on 10% reducing SDS-PAGE and immunoblotted on nitrocellulose with anti-mouse SR-BI polyclonal antibody at 1:4000 or with anti-human CD36 polyclonal antibody at 1:250, polyclonal anti-caveolin-1 antibody at 1:5000 and polyclonal anti-LDLr at 1:250

followed by enhanced chemiluminescence detection on Kodak Biomax ML film. Protein expression was measured by densitometric scanning and analyzed with ImageQuant 5.2 software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Results are based on averages of at least 3 different gel runs from different protein extractions.

#### *Lipoprotein cell association assay*

Cells were washed twice with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 3 hours at 37°C with 10 µg protein/ml of <sup>125</sup>I-lipoprotein or <sup>3</sup>H-CE-lipoproteins in a total volume of 250 µl containing 125 µl of MEM [2×] plus 4% bovine serum albumin (MEM-BSA), pH 7.4 (total association). Non-specific association was determined by the addition of 2 mg protein/ml of the proper unlabelled lipoproteins. At the end of the incubation, the cells were washed twice with 1 ml of PBS plus 0.2% BSA followed by two washes with 1 ml of PBS. The cells were then homogenized in 1.5 ml of 0.2 N NaOH. Cell protein content was estimated and 125-iodine radioactivity counts in the homogenates were obtained with a Cobra II counter (Canberra-Packard) while associated <sup>3</sup>H-CE was quantified by liquid scintillation counting (Wallack Beta Counter). The results are expressed in µg lipoprotein protein/mg cell protein. The specific association was calculated by subtracting the non-specific association from the total association. To compare the association of lipoproteins labelled in protein (<sup>125</sup>I) or in CE (<sup>3</sup>H), the association data of <sup>3</sup>H-CE-lipoprotein were estimated as µg protein/mg cell protein (apparent uptake). To achieve this, the specific activity of <sup>3</sup>H-CE-lipoprotein was expressed in cpm/µg lipoprotein protein. CE selective uptake by hepatocytes is demonstrated when specific [<sup>3</sup>H]CE-lipoprotein association minus specific <sup>125</sup>I-lipoprotein association is greater than zero. Degradation was not taken into account as all types of lipoproteins were poorly degraded during the course of the incubation.

#### *Cholesterol efflux assay*

Cells were labelled with 1 µCi [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-cholesterol for 24 h at 37°C and then equilibrated with 1 ml of MEM-0.2% BSA for 24 h at 37°C. Efflux assay was performed in the absence or presence of 50 µg/ml HDL<sub>3</sub> for 4 h at 37°C. At the end of the incubation, the media was recuperated and the cells were solubilized in 1.5 ml of 0.1 N NaOH, assayed for protein content and counted for radioactivity in beta-counter (Wallach-Fisher). Percentage of efflux

was calculated by subtracting the radioactive counts in the absence of HDL<sub>3</sub> from the radioactive counts in the presence of HDL<sub>3</sub> and then divided by the sum of the radioactive counts in the media plus the cell fraction.

*Other methods*

Protein content was determined by the method of Lowry *et al.* (1951) with BSA as standard. Student's t test was used to obtain statistical comparison of the data. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The aim of this study was to quantify the ability of mouse liver parenchymal and nonparenchymal cells in LDL-, OxLDL- and HDL-CE selective uptake and in their free cholesterol efflux to HDL. The protocol that we used to separate mouse hepatic parenchymal (hepatocytes) from nonparenchymal cells (Kupffer and endothelial cells) was based on cell sizes and densities. The purity of the preparations was established by FACS separation based on cell size (FCS) and cell complexity (SSC). As seen in Figure 1, both fractions were 85% pure. Fluorescent latex beads confirmed the presence of Kupffer cells in the nonparenchymal cell fraction, while an anti-cluster of differentiation-31 antibody was used as an endothelial cell marker (data not shown). The levels of various receptors and proteins involved in lipoprotein metabolism were quantified in mouse liver parenchymal and nonparenchymal cells. Figure 2 shows that the levels of SR-BI and CD36 are approximately 2-fold higher while those of LDLr are 3-fold higher in parenchymal cells than in nonparenchymal cells. Caveolin-1 was only detectable in nonparenchymal cells.

The two different preparations of cells were incubated with LDL or HDL labelled either in protein with iodine-125 or in CE with <sup>3</sup>H-cholesterol oleate and lipoprotein-protein and lipoprotein-CE associations were measured. Figure 3 shows that compared to parenchymal cells, nonparenchymal cells associate 5 times more LDL-protein and twice the amount of LDL-CE ( $p < 0.05$ ). However, in terms of CE-selective uptake (protein association – CE association) both types of cells are equivalent. Nonparenchymal cells also associate more HDL-protein than parenchymal cells (3 times;  $p < 0.05$ ), however they associate 45% less HDL-CE ( $p < 0.05$ ). In contrary to parenchymal cells, nonparenchymal cells do not show HDL-CE selective uptake activity. Nonparenchymal cells associate 4.5 times more OxLDL-protein than parenchymal cells ( $p < 0.05$ ). They also associate twice more OxLDL-CE and perform more CE-selective uptake from those. However, these last values did not reach statistical significance. Thus parenchymal cells can selectively take CE from the three types of lipoproteins, while nonparenchymal cells exert this function only on LDL and OxLDL. It is also noteworthy that both types of cells show higher abilities in OxLDL-CE than in LDL-CE selective uptake (in average by 3.4 fold). Experiments were also conducted to compare

the ability of parenchymal and nonparenchymal cells to efflux cell cholesterol to HDL. Table I shows that efflux is 3.5 fold more important in nonparenchymal than in parenchymal cells.



## DISCUSSION

We compared the ability of mouse liver parenchymal and nonparenchymal cells in HDL metabolism. We found that only parenchymal cells can selectively take CE from HDL. Previously, Fluiters *et al.* (1998) showed that rat Kupffer cells had much less ability to selectively take up CE from HDL than parenchymal cells. Thus our work confirms theirs in another rodent, the mouse, and further indicates that endothelial cells do not show a high ability in CE selective uptake as our nonparenchymal pool of cells contains also endothelial cells. We found that HDL is four times better at cholesterol efflux from nonparenchymal than parenchymal cells. SR-BI is likely not responsible for this difference in efflux since it is less abundant in nonparenchymal cells, unless its efflux capacity is increased by its localization in caveolae. Alternatively, this phenomenon may relate to the much greater expression of caveolin-1 in nonparenchymal cells as caveolin-1 is also an efflux mediator (Fielding and Fielding 1995A). Thus as far as HDL metabolism is concerned, parenchymal and nonparenchymal cells play opposite roles, the former in cholesterol influx and the later in efflux. Locally in the liver, this may link nonparenchymal cell cholesterol to cholesterol excretion in the bile via CE selective uptake from cholesterol enriched HDL by hepatocytes.

We have shown in the past that HepG2 cells (human hepatoma) can selectively retrieve CE from LDL and OxLDL (Rhoads *et al.* 1999) and that the pathway towards LDL involves SR-BI (Rhoads *et al.* 2003). In the present study, we provide data on LDL- and OxLDL-CE selective uptake in mouse parenchymal and nonparenchymal hepatic cells. Indeed, we show for the first time that both types of cells exert that function on LDL and OxLDL. However, differently from observed with HDL, we found that nonparenchymal cells are better than parenchymal cells to conduct CE-selective uptake from LDL and OxLDL (1.5 to 2-fold). This suggests either that when SR-BI is in caveolae (nonparenchymal cells), it has a high activity towards LDL and OxLDL but none towards HDL or that another receptor expressed by nonparenchymal cells has a significant activity towards LDL and OxLDL but not HDL. CD36 is a potential candidate as it is known to interact with HDL, LDL, OxLDL, to have a lower ability than SR-BI to selectively take up CE from HDL (de Villiers *et al.* 2001) and more recently to be equipotent to SR-BI towards LDL-CE uptake (Connelly *et al.* 2003).

However, its ability towards OxLDL-CE selective uptake remains unknown. Other experiments are therefore required to resolve these issues. Furthermore, it has to be taken into consideration that our study revealed the potential of each type of cells when isolated from each other. Considering the contribution of all cells in the liver, it is likely that *in vivo*, parenchymal cells play a preponderant role in LDL- and OxLDL-CE selective uptake.

Overall our work shows that mouse parenchymal and nonparenchymal hepatic cells have different preferences for lipoproteins as far as CE-selective uptake is concerned, the former for HDL and the latter for LDL. Nonparenchymal cells are also more susceptible to cholesterol efflux than parenchymal cells.

Table I: Parenchymal and nonparenchymal cell cholesterol efflux to HDL. Mouse liver parenchymal and nonparenchymal cells pre-incubated with [<sup>3</sup>H]-cholesterol were exposed to HDL<sub>3</sub> (50 μg/ml) and cholesterol efflux was measured as described in Experimental Procedures. Each result represents the mean percentage ± SEM of the number of experiments indicated in parentheses each conducted in triplicate.

<sup>a</sup> Significantly different (p<0.0005) from the results obtained with parenchymal cells.

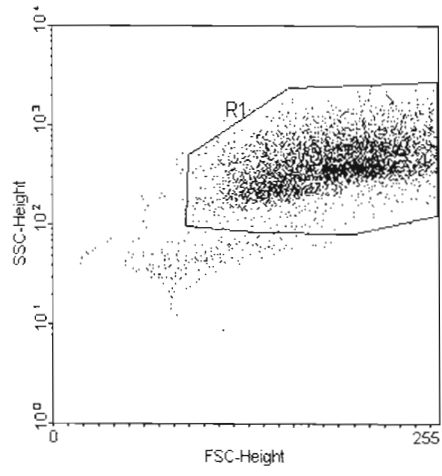
<b>Cell preparations</b>	<b>Percentage of efflux (%)</b>
<b>Parenchymal cells</b>	3.7±1.2
<b>Nonparenchymal cells</b>	14.4±1.8 <sup>a</sup>

## Figure Legends

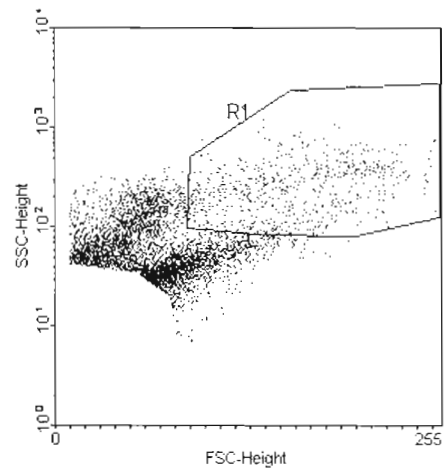
Figure 1. Analysis of the cell purity by FACS separation. Mouse livers were perfused and parenchymal and nonparenchymal cells were separated as described in Experimental Procedures. Each preparation was separated on cell size (FCS) and cell complexity (SSC).

Figure 2. Immunoblot analysis of SR-BI, CD36, LDLr and caveolin-1 expression in mouse hepatic parenchymal and nonparenchymal cells. Liver cells were isolated and their proteins extracted as described in Experimental Procedures. A) Proteins (100 µg) from parenchymal cells (P) and nonparenchymal cells (NP) isolated on three different occasions were separated on 10% reducing SDS-PAGE and immunoblotted with either anti-LDL-receptor, or anti-SR-BI or anti-CD36. B) Indicated quantities of proteins (100 µg to 450µg) from parenchymal cells (P) and nonparenchymal cells (NP) were separated on 12% reducing SDS-PAGE and immunoblotted with anti-caveolin-1 antibody. The proteins were detected by enhanced chemiluminescence. The images are representative of three independent experiments.

Figure 3. [<sup>3</sup>H]CE and <sup>125</sup>I-protein association of HDL and LDL and oxLDL with primary cultures of mouse liver parenchymal and nonparenchymal cells. Parenchymal (black bars) and nonparenchymal cells (hatched bars) were incubated with 20 µg/ml radiolabelled lipoproteins for 3 hours at 37°C and were processed for <sup>125</sup>I-protein association (Prot.), [<sup>3</sup>H]CE association (CE) and CE selective uptake (CE s.u.). Results are shown as the mean +/- s.e.m. of 3-5 experiments. All experiments were conducted in triplicates.



**Parenchymal cells**



**Nonparenchymal cells**

Figure 1



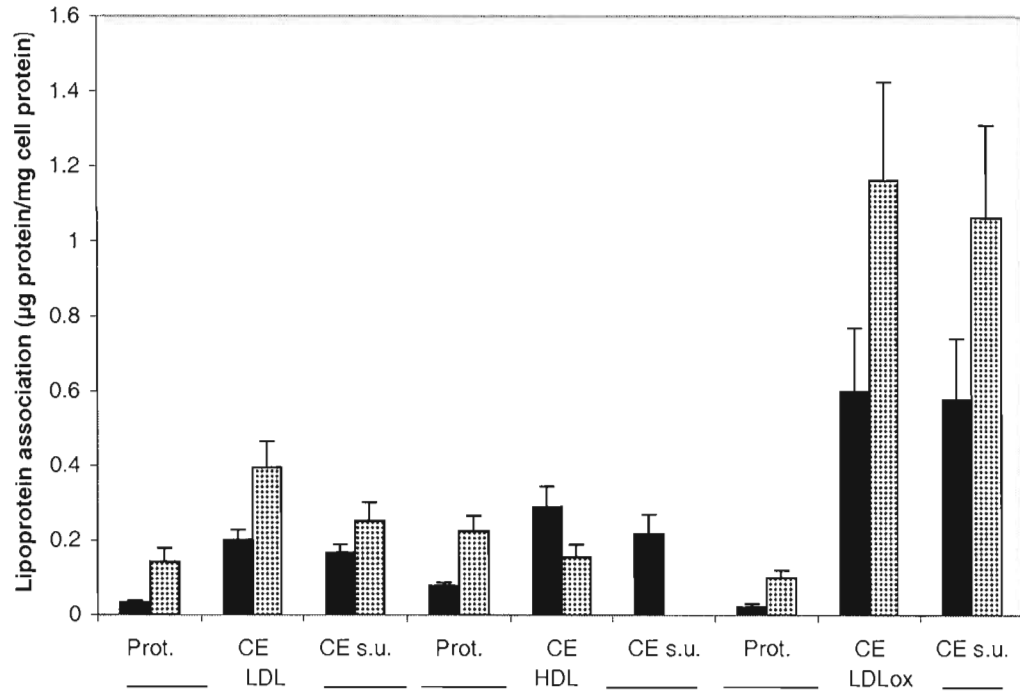


Figure 3

CHAPITRE 3:

Opposite Effect of Caveolin-1 in the Metabolism of  
High-Density and Low-Density Lipoproteins

Biochim. Biophys. Acta Janvier 2006, 1761(1):24-36.



Opposite Effect of Caveolin-1 in the Metabolism of  
High-Density and Low-Density Lipoproteins†

To Quyen Truong\*, Dominique Aubin, Philippe Bourgeois,  
Louise Falstraull and Louise Brissette

Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal,  
Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

\* To whom correspondence should be addressed:

To Quyen Truong

Département des Sciences Biologiques

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succursale Centre-ville

Montréal, Québec

Canada H3C 3P8

Tel: (514) 987-3000 ext. 4368; Fax: (514) 987-4647

E-mail: [truong.to\\_quyen@courrier.uqam.ca](mailto:truong.to_quyen@courrier.uqam.ca)

†This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR) (grant MOP-5309) attributed to L.B. L.B. was the recipient of a senior scientist scholarship from “Fonds de la recherche en santé du Québec” (FRSQ). T.Q.T. was the recipient of scholarships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the “Fonds pour la formation des chercheurs et l’aide à la recherche” (FCAR).

Running title: Hepatic caveolin-1 in cholesterol metabolism

## SUMMARY

Receptors of the scavenger class B family were reported to be localized in caveolae, the cell surface microdomains rich in free cholesterol and glycosphingolipids, which are characterized by the presence of caveolin-1. Parenchymal hepatic and hepatoma HepG2 cells express very low levels of caveolin-1. In the present study, stable transformants of HepG2 cells expressing caveolin-1 were generated to address the effect of caveolin-1 on receptor activity. Compared to normal cells, these cells show higher  $^{125}\text{I}$ -bovine serum albumin (BSA) uptake and cholesterol efflux, two indicators of functional caveolae. By immunoprecipitation, cell fractionation and confocal analyses, we found that caveolin-1 is well colocalized with the cluster of differentiation-36 (CD36) and the low-density lipoprotein (LDL) receptor (LDLr) but to a lesser extent with the scavenger receptor class B type I (SR-BI) in HepG2 cells expressing caveolin-1. However, caveolin-1 expression favors the dimerization of SR-BI. Two clones of cells expressing caveolin-1 were investigated for their lipoprotein metabolism activity. Compared to normal cells, these cells show a 71-144% increase in  $^{125}\text{I}$ -LDL degradation. The analysis of the cholesteryl esters (CE)-selective uptake (CE association minus protein association) revealed that the expression of caveolin-1 in HepG2 cells decreases by 59%-73% LDL-CE selective uptake and increases high-density lipoprotein (HDL)-CE selective uptake by 44%-66%. We conclude that the expression of caveolin-1 in HepG2 cells moves the balance of LDL degradation/CE selective uptake towards degradation and favors HDL-CE selective uptake. Thus, in the normal hepatic parenchymal situation where caveolin-1 is poorly expressed, LDL-CE selective uptake is the preferred pathway.

## INTRODUCTION

Traditionally, caveolae are considered as a subset of lipid rafts. They could now be termed as two distinct populations of cell surface microdomains since it is known that certain proteins preferentially partition into lipid rafts or caveolae but not both (Liu et al. 1997A). They are both rich in free cholesterol (FC) and glycosphingolipids (Brown & Rose 1992) and characterized by their resistance to detergent extraction at 4<sup>0</sup>C (Kurzchalia et al. 1992) and their light density on sucrose gradients (Smart et al. 1995). They also participate in several cellular functions such as in cellular cholesterol homeostasis, lipid transport, potocytosis and cell surface signalling (Anderson 1993, Lisanti et al. 1995). Their size, stability and shape differ from one another. The main difference resides in the presence or absence of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins (enriched in lipid rafts) (Iwabuchi et al. 1998) or caveolins (present in caveolae) Glenney & Zokas 1989, Rothberg et al. 1992). There are three isoforms of caveolin, caveolin-1 being the main component in non-muscle cell caveolae. It is a 22-kDa integral membrane protein which forms a hairpin-loop structure in the lipid bilayer. Caveolin-1 can be differentiated into caveolin-1  $\alpha$  and caveolin-1  $\beta$  (Scherer et al. 1995). The  $\beta$  isoform has been observed in many transformed cells but does not alone form caveolae (Fujimoto et al. 2001). It is also known that caveolin-1 is involved in stabilizing the invaginated structure of caveolae through oligomerization (with itself and with caveolin-2) (Fra et al. 1995). Caveolin-1 binds specifically to cholesterol (Murata et al. 1995) and facilitates transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane (Smart et al. 1996). Additionally, it has been demonstrated that caveolae and caveolin-1 can mediate cellular cholesterol efflux to plasma (Fielding & Fielding 1996). Finally, caveolin-1 has an ability to bind fatty acids with high affinity (Trigatti et al. 1999B) and recently, studies by Pohl et al. (Pohl et al. 2002, 2004) revealed a role of caveolae/lipid rafts in cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids.

Plasma concentrations of LDL are directly correlated with the incidence of atherosclerosis, whereas HDL are inversely correlated. The two classes of lipoproteins follow both holoparticle (internalization and complete degradation) and CE-selective uptake pathways. LDLr is a 160-kDa protein responsible for holoparticle uptake of LDL (for a review see

Goldstein & Brown 1985), while the identity of the hepatic receptor mediating HDL endocytosis/degradation has not been clearly defined. SR-BI is an 82-kDa protein (Acton et al. 1994) that binds native and modified lipoproteins and mediates selective uptake of CE from both HDL (Acton et al. 1996) and LDL (Swarnakar et al. 1999). SR-BI is abundant in liver and steroidogenic organs (Landschulz et al. 1996) and performs the last step of reverse cholesterol transport. This transport involves the removal of excess free cholesterol by HDL from extra-hepatic cells, its esterification in the circulation by lecithin cholesterol acyl transferase, and return to the liver via the SR-BI pathway for eventual excretion in the bile. We have recently shown (Rhainds et al. 2003) that SR-BI is responsible for more than 80% of CE selective uptake from LDL and HDL in HepG2 cells. Others have demonstrated that SR-BI is also involved in cholesterol efflux (de la Llera-Moya et al. 1999, Ji et al. 1997). Moreover, the expression of SR-BI is negatively correlated with atherosclerosis in mouse models (Arai et al. 1999, Trigatti et al. 1999A). Recently, Webb et al. (1998) discovered an alternative mRNA splicing variant of SR-BI, called SR-BII, which differs from SR-BI by an entirely different C-terminal cytoplasmic tail. In liver, SR-BII accounts for 10-15% of SR-BI/II protein (Graf et al. 2001).

In 1997, Babitt et al. (1997) reported that SR-BI is concentrated in caveolae using Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing murine SR-BI. The activity of SR-BI was suggested to be linked to its localization in caveolae (Graf et al. 1999) and quite a few studies were conducted to verify this hypothesis. However, many studies led to conflicting results as shown by the following. Matveev et al. (1999) demonstrated that the increase of caveolin-1 expression in differentiated macrophages THP-1 is associated with an enhanced HDL-CE selective uptake and showed later that this mechanism is independent of SR-BI (2001). This same group also reported that the expression of caveolin-1 in CHO cells and macrophage cell lines (RAW and J774) decreases HDL-CE selective uptake while it has no effect on cholesterol efflux (Matveev et al. 2001), Frank et al. (2001) showed that caveolin-1 downregulation in NIH/3T3 fibroblasts induces a more rapid efflux to HDL. Also, this same group demonstrated that the expression of caveolin-1 in human embryonic kidney cells 293 (HEK-293) has no effect on SR-BI mediated cholesterol efflux to reconstituted HDL (Frank et al. 2002). Finally, the study by Wang et al. (2003) concluded that the expression of

caveolin-1 in Fisher rat thyroid (FRT) and HEK-293 cells does not affect SR-BI mediated cholesterol efflux or selective uptake of HDL-CE. Some of the apparent conflicting results might be related to the cell types and species investigated. It is also noteworthy that even though hepatic cells are responsible for most lipoprotein metabolism and show high SR-BI and low caveolin-1 expression (Li et al. 2001) compared to other cells, they received little attention. The only work on hepatic cells was conducted on primary cultures of mouse hepatocytes infected with an adenovirus containing caveolin-1 cDNA (Frank et al. 2001B) and the study reported that caveolin-1 expression induces a modest 10% decrease in dioctadecyl-tetramethylindocarbocyanin (DiI)-HDL uptake. Hence, we have to conclude that up until now, no classical study on CE-selective uptake has been conducted on hepatic cells towards the effect of caveolin-1 expression. Moreover, LDL metabolism was never addressed in association with caveolin-1 expression.

In this study, we chose to work with the HepG2 cell model as it is derived from human hepatic parenchymal cells. These cells were reported to lack caveolae (Fujimoto et al. 2001, Fu et al. 2004). We used a constitutive expression strategy to obtain cells expressing high levels of caveolin-1. In these cells, caveolin-1 was shown to colocalize somewhat with SR-BI but colocalizes to a greater extent with CD36 and LDLr. The expression of caveolin-1 enhances BSA uptake and efflux of [<sup>3</sup>H]-cholesterol to HDL<sub>3</sub>. We show that caveolin-1 expression in HepG2 cells increases the binding of HDL<sub>3</sub> while it reduces that of LDL and increases the degradation of LDL. Finally, we observed that caveolin-1 expression induces the formation of SR-BI dimers but not of SR-BII dimers in HepG2 cells and increases the CE-selective uptake from HDL<sub>3</sub> and reduces that from LDL.

## MATERIALS AND METHODS

*Materials.* Human plasma was obtained from the Royal Victoria Hospital (Montréal, Québec). Dr. Bernard Schimmer (University of Toronto) provided Y1-BS1 cells and the human hepatoma cell line HepG2 and the plasmid pT7T3D-Pac containing the full-length human caveolin-1 cDNA were obtained from ATCC (Rockville, MD). The plasmids pBluescript KS- and pRc/CMV as well as TRIzol reagent were purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario). Minimal essential medium (MEM) and G418 were from Life Technologies (Burlington, Ontario). Fetal Clone I was purchased from HyClone (Logan, UT) while fatty acid-free (FFA) or regular bovine serum albumin (BSA) (fraction V), n-octyl glucoside, OptiPrep, Protein G-Sepharose, cholesterol oxidase (COase) and neutral sphingomyelinase (SMase) were obtained from Sigma-Aldrich (Mississauga, Ontario). [<sup>125</sup>I] (as sodium iodide, 100 mCi/ml), [<sup>3</sup>H]-cholesteryl oleate (30-60 Ci/mmol) and [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-cholesterol (40-60 Ci/mmol) were bought from ICN Biomedical (Montréal, Québec), Amersham (Oakville, Ontario) and Perkin Elmer Life Sciences (Woodbridge, Ontario), respectively. Antibodies and their sources were as follows: rabbit IgG anti-caveolin-1 (polyclonal antibody- pAb C13630) and mouse IgG anti-caveolin-1 (monoclonal antibody-mAb 2297) from BD-Transduction Laboratories (Mississauga, Ontario); rabbit IgG anti-SR-BI, anti-SR-BII and anti-ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) from Novus Biologicals (Littleton, CO); rabbit IgG anti-LDLr from Research Diagnostics, Inc. (Flanders, NJ); mouse IgG anti-CD36 antibody FA6-152 from Immunotech (Westbrook, Maine); mouse IgG anti-clathrin heavy chain monoclonal antibody (clone TD.1) and anti-β-actin was purchased from Sigma-Aldrich (Mississauga, Ontario). Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG secondary antibodies from Molecular Probes (Eugene, Oregon). Human caveolin-1 primers for PCR were purchased from Qiagen (Mississauga, Ontario).

*Preparation of Stable Transformants Expressing Caveolin-1.* The plasmid pT7T3D-Pac containing the full-length human caveolin-1 cDNA was digested with EcoRI and NotI while, in parallel, the plasmid pBluescript KS- was digested with the same enzymes for subcloning. The plasmid pBluescript KS- containing the cDNA of caveolin-1 was digested with HindIII

and NotI and similar enzymes were used to insert the cDNA in the expression vector pRc/CMV for further transfection in HepG2 cells, using the standard calcium phosphate method. G418-resistant cells were selected with 500 µg/ml G418 and clones were isolated.

*Cell Culture.* HepG2 cells were grown in MEM supplemented with 10% fetal clone I, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) and L-glutamine (4 mM). Medium was changed every 2-3 days and cells were propagated every 7 days. Three days prior to the assay,  $4.5 \times 10^5$  cells were seeded in 3.8 cm<sup>2</sup> culture dishes (12-well dish).

*RNA Isolation and Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction.* Total RNA from different subtypes of HepG2 cells was extracted using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. For normal HepG2 cells, mRNA was also isolated from 150 µg of total RNA using the Qiagen Oligotex mRNA Mini Kit. Reverse transcription (RT) was performed on 2 µg of total RNA or the whole mRNA isolated using the Qiagen Omniscript Kit. Synthesis of cDNA was carried out for 60 min at 37°C and 45 minutes at 42°C. A quarter of this reaction mixture was used for the subsequent polymerase chain reaction (PCR) using human caveolin-1 primers. The set of primers defines a 418 bp coding region of caveolin-1 and were designed as followed: sense primer, 5'-CGAGAAGCAAGTGTACGACGC-3'; antisense primer, 5'-TTTCTGCAAGTTGATGCGGAC-3'. PCR cycle conditions were 95°C for 1 minute, 58°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute for 40 cycles with an initial denaturation at 95°C for 5 minutes and a final extension of 7 minutes at 72°C. The PCR products were size fractionated on 2% agarose gels and visualized with ethidium bromide.

*Caveolae Purification and immunoprecipitation of the caveolae fraction.* All steps were carried out at 4°C as described previously by Smart et al. (1995). A plasma membrane fraction was prepared from five 100-mm dishes or ten T75 flasks of confluent cultured cells. This method isolates four fractions: the cell lysate (CL: 30-40 mg of protein), postnuclear supernatant (PNS: 7-12 mg of protein), plasma membrane (PM: 1-2 mg of protein) and caveolae membrane (CM: 50-100 µg of protein). CM fractions were concentrated by TCA precipitation, washed in acetone and resuspended in buffer A (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 4% 2-mercaptoethanol). For immunoprecipitation, the CM fraction

(50 µg) was precleared for 2 hours at 4°C with protein G-sepharose beads with constant rocking. Cleared lysate was incubated with a polyclonal anti-caveolin-1 antibody at 4°C overnight. Protein G-Sepharose beads were added to the samples and incubated at 4°C for an additional 2 hours. The beads were sedimented by centrifugation and the immunoprecipitate (IP) and the supernatant (S) were collected. The beads were washed five times in high salt immunoprecipitation buffer (500 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, and 50 mM Tris, pH 8.0) and eluted into Laemmli sample buffer. Immunoprecipitated and supernatant proteins were separated by SDS-PAGE and detected by immunoblotting.

*Isolation of lipid rafts by discontinuous sucrose gradient.* HepG2 cells were fractionated by sucrose gradients as described elsewhere (Song et al. 1996A). Thirteen fractions were analysed by immunoblotting. In some experiments, cells were preincubated with cholesterol oxidase (COase) at 1 U/ml and sphingomyelinase (SMase) at 0.5 U/ml for 1 hour at 37°C as in Rhainds et al. (2004).

*Confocal Fluorescence Microscopy.* Cells ( $8 \times 10^4$  cells/well) were plated on 4-well Nunc Lab-Tek prior to fixation and staining for immunofluorescence at room temperature. Mainly, cells were washed twice with PBS, fixed for 60 minutes with 3.7% paraformaldehyde, washed three times with PBS (10 minutes each), permeabilized for 20 minutes with a blocker solution (PBS containing 0.1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.2% gelatin, and 0.05% Triton X-100), washed three times (5 minutes each) in wash buffer (PBS, 0.02% azide, 0.2% gelatin), incubated with primary antibody or two primary antibodies (for dual immunofluorescence), either rabbit anti-SR-BI antibody (1:500) and mouse anti-caveolin-1 antibody (1:100) or rabbit anti-caveolin-1 antibody (1:500) and mouse anti-CD36 antibody FA6-152 (1:100) or rabbit anti-LDLr antibody (1:100) and mouse anti-caveolin-1 antibody (1:100) in wash buffer supplemented with 25% fetal clone I for 1 hour, rinsed four times in wash buffer (7 minutes each), incubated with secondary Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG in wash buffer supplemented with 25% fetal clone I for 1 hour in the dark, and rinsed in wash buffer four times (7 minutes each). All samples were viewed using a Bio-Rad laser confocal fluorescence microscope. Natural fluorescence was also evaluated



with secondary Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG.

*Protein Expression.* To measure cell proteins, cells were extracted for 45 minutes on ice with buffer E (20 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 60 mM n-octyl glucoside, 1 mM PMSF and complete miniprotease inhibitor cocktail tablets) or obtained by the method of Yoshimura et al. (1987). Liver mouse tissue was sonicated in buffer A and concentrated by precipitation in trichloroacetic acid (TCA) as described by Li et al. (2001). Proteins (50-500  $\mu$ g) were separated by 6, 10 or 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by western blotting to nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 5% dry milk for 90 minutes or incubated overnight with 2% dry milk. Primary antibodies such as pAb anti-caveolin-1 (1:5000), mAb anti-caveolin-1 (1:2000), anti-SR-BI (1:5000), anti-SR-BII (1:2000) anti-ABCA1 (1:500), anti-clathrin heavy chain (1:1000), anti-LDLr (1:500) or anti- $\beta$ -actin were diluted in buffer b (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated with the nitrocellulose membranes for 2 hours at 37<sup>o</sup>C. The membranes were washed three times for 5 minutes with buffer b. The second antibodies (goat anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase) were diluted in buffer b and incubated with membrane as described for primary antibodies. The membranes were washed three times for 5 minutes with buffer b and the bands visualized using enhanced chemiluminescence. To measure apolipoproteins (apoA-I and apoE) secreted by the cells, the ELISA method of Fredenrich et al. (1997) was used.

*Preparation and Radiolabeling of Lipoproteins.* To the plasma was added 0.01% (w/v) of EDTA, 0.02% (w/v) of sodium azide and 10  $\mu$ M of PMSF before the isolation of lipoproteins, which was achieved by ultracentrifugation. Human LDL (density 1.025-1.063 g/ml) and HDL<sub>3</sub> (density 1.125-1.21 g/ml) were prepared as described by Brissette and Noël (1986). LDL, HDL<sub>3</sub> and BSA-FFA were iodinated by a modification (Langer et al. 1972) of the iodine monochloride method of McFarlane (1948). Sodium 125-iodide (0.75 mCi) was used to iodinate 2 mg of LDL, HDL<sub>3</sub> or BSA-FFA in the presence of 40 nmol of iodine monochloride in 0.5 M glycine-NaOH, pH 10. Free iodine was removed by gel filtration on Sephadex G-25 followed by an overnight dialysis in Tris-buffered saline (TBS). The specific

radioactivity ranged from 100,000-400,000 cpm/ $\mu$ g of protein. LDL and HDL<sub>3</sub> were radiolabeled in their CE with [<sup>3</sup>H]-cholesteryl oleate as described by Roberts et al. (1985). Thereafter, the labeled LDL and HDL<sub>3</sub> were reisolated by ultracentrifugation. The specific activity of lipoproteins labeled in CE ranged from 3,000-12,000 cpm/ $\mu$ g of protein.

*BSA Uptake Assay.* The cells were equilibrated with 1 ml of MEM for 1 hour at 37<sup>0</sup>C. After, the cells were washed twice with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and were then incubated for 2 hours at 37<sup>0</sup>C with 20  $\mu$ g/ml of <sup>125</sup>I-BSA in 125  $\mu$ l of MEM in a total volume of 250  $\mu$ l. At the end of the incubation, the cell monolayers were washed four times with 0.2 M acetic acid and 0.5 M NaCl buffer, pH 2.5. The cells were solubilized in 1.5 ml of 0.1 N NaOH, assayed for protein content and counted for radioactivity in a Cobra II counter (Canberra-Packard).

*Cholesterol Efflux Assay.* Confluent cells were labeled with 1  $\mu$ Ci [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-cholesterol for 24 hours at 37<sup>0</sup>C and then equilibrated with 1 ml of MEM-0.2% BSA for 24 hours at 37<sup>0</sup>C. Efflux assay was performed in the absence or presence of 50  $\mu$ g/ml HDL<sub>3</sub> for 4 hours at 37<sup>0</sup>C. At the end of the incubation, the medium was recuperated and the cells were solubilized in 1.5 ml of 0.1 N NaOH, assayed for protein content and counted for radioactivity in beta-counter (Wallach-Fisher). Percentage of efflux was calculated by subtracting the radioactive counts of the absence of HDL<sub>3</sub> from the radioactive counts in the presence of HDL<sub>3</sub> and then divided by the sum of the radioactive counts in the media plus the cell fraction.

*Binding Assay.* The cells were washed twice with 1 ml of PBS. Cells were incubated for 2 hours at 4<sup>0</sup>C with 50  $\mu$ g of protein/ml of <sup>125</sup>I-LDL or <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub> in a total volume of 250  $\mu$ l containing 125  $\mu$ l of MEM [2 $\times$ ] plus 4% BSA and 25 mM HEPES, pH 7.4 (total binding). Non-specific binding was determined by the addition of 2 mg of protein/ml of the appropriate non-labeled lipoprotein. The cells were solubilized in 1.5 ml of 0.1 N NaOH, assayed for protein content and counted for radioactivity in a Cobra II counter (Canberra-Packard). The specific binding was calculated by subtracting the non-specific binding of <sup>125</sup>I-labeled lipoprotein from the total binding.

*Cell Association and Degradation Assays.* Cell association of  $^{125}\text{I}$ -lipoprotein and  $^3\text{H}$ -CE-lipoprotein (20  $\mu\text{g}$  of protein/ml) was conducted for 4 hours at  $37^\circ\text{C}$ , as for the binding assay but without HEPES. Associated protein was quantified with a Cobra II counter (Canberra-Packard) and associated CE was counted with a beta-counter (Wallach-Fisher). Associations of  $^{125}\text{I}$ -lipoprotein and  $^3\text{H}$ -CE-lipoprotein are expressed in  $\mu\text{g}$  of protein per mg of cellular protein. Selective uptake is calculated by subtracting the protein association from the CE association. Degradation of  $^{125}\text{I}$ -LDL (20 and 50  $\mu\text{g}$  of protein/ml) was conducted for 5 hours at  $37^\circ\text{C}$ , as described in cell association assay. At the end of the incubation, the medium was recovered and precipitated with TCA at a final concentration of 12%. Degradation was estimated in the TCA-soluble fraction, as described by Truong et al. (2000). Cells were also solubilized in 1.5 ml of 0.1 N NaOH and assayed for protein content to normalize for cell protein.

*Other Methods.* Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951) with BSA as standard. Two-tailed Student's paired t-tests were used to determine significant differences between results.

## RESULTS

*Expression of Caveolin-1 in Various Cells.* Our first goal was to determine the expression level of caveolin-1 in HepG2 cells and compare it to other cells solubilized with octyl glucoside. Figure 1 shows that caveolin-1 is expressed highly in human fibroblasts, moderately in Y1-BS1 murine adrenal cells, and at a low level in mouse liver tissue, while HepG2 cells do not express a detectable amount of caveolin-1 (up to 500  $\mu$ g of protein, data not shown). Since we could not detect any trace of caveolin-1 protein in HepG2 cells, we assessed the transcript level by RT-PCR. Figure 2a demonstrates the absence of a detectable amount of caveolin-1 transcript by RT-PCR from total RNA of HepG2 cells but shows an amplification product of 418 bp corresponding to caveolin-1 transcript when HepG2 cell mRNA was used as a template. Altogether, these results indicate that although HepG2 cells do not express a detectable level of caveolin-1 protein at the plasma membrane, caveolin-1 gene is transcribed but at an apparent low efficiency.

*Stable Transformants of HepG2 Cells Expressing Caveolin-1.* In order to assess the potential roles of caveolin-1 in HepG2 cells, we generated stable transformants of HepG2 cells expressing this protein. We constructed an expression vector pRc/CMV containing the full length of caveolin-1 cDNA and transfected it to HepG2 cells. Other HepG2 cells were transfected with the vector pRc/CMV without insert and these cells were thus called control cells. Cellular clones were obtained and the expression of caveolin-1 was determined by western blotting using 2 antibodies: one polyclonal (C13630) and one monoclonal (2297). Twenty-five clones were tested. From these clones, 4 did not express caveolin-1, 12 expressed highly and 9 expressed very highly caveolin-1 (data not shown). Our results by RT-PCR show the absence of caveolin-1 transcript from total RNA fraction in control cells while caveolin-1 transcripts are detectable in two clones of HepG2 cells expressing a high (cav9) and a very high level of caveolin-1 (cav13) (figure 2a). Figure 2b shows a western blot analysis of these 2 clones. Since HepG2 cells and control cells do not show a detectable amount of caveolin-1, we have defined that cav13 cells express 100% of caveolin-1 while cav9 cells express 84% ( $p < 0.05$ ) when detected with the polyclonal antibody and 57% ( $p < 0.01$ ) when using the monoclonal antibody. Also, using the polyclonal anti-caveolin-1

antibody, we have determined that cav9 and cav13 cells express 7-fold and 4-fold less caveolin-1 than human skin fibroblasts while they express 3-fold and 5-fold more than Y1-BS1 cells (data not shown).

*Assessment of the effect of caveolin-1 expression on the membrane localization of various key molecules for lipoprotein metabolism.* To verify the localization of SR-BI when caveolin-1 is expressed or not in HepG2 cells, we fractionated cell constituents from Y1-BS1 cells and our different subtypes of HepG2 cells. The subcellular fractionation experiment is based on a non-detergent procedure described by Smart et al. (1995). Using this approach, we have successfully isolated several distinct membrane compartments and have used SR-BI and anti-caveolin-1 antibodies to determine if both proteins copurify. These compartments include cell lysate (CL), postnuclear supernatant (PNS), plasma membrane (PM), and caveolae membrane (CM). Equal amounts of protein (20 µg) from each subcellular fraction were loaded on a gel. As expected figure 3A demonstrates that control cells show no trace of caveolin-1 in all compartments. Interestingly, SR-BI is ubiquitous in all compartments suggesting that SR-BI does not require caveolin-1 to be found in a membrane fraction having the density of CM (presumably lipid rafts). Similar results were obtained with normal HepG2 cells (data not shown). When caveolin-1 is expressed in HepG2 cells, SR-BI and caveolin-1 are detectable in all subcellular fractions but these 2 proteins are more abundant in CM fraction (figure 3B). In Y1-BS1 cells, SR-BI was present in all subcellular fractions while caveolin-1 was only detected in PM and CM fractions (figure 3C). As previously reviewed by Pike (2004), this method does not discriminate lipid rafts from caveolae. To define the proper compartment of SR-BI, a purified CM fraction from HepG2 cells expressing caveolin-1 was immunoprecipitated with an anti-caveolin-1 antibody. The precipitated and non-precipitated fractions were subjected to SR-BI and caveolin-1 detection. Figure 3D shows that most of caveolin-1 is immunoprecipitated but on the other hand SR-BI is precipitated by approx. 20%, indicating that a significant portion but not all SR-BI is in the caveolae fraction.

We obtained additional information using immunofluorescence microscopy. Figure 4 compares SR-BI and caveolin-1 localization in Y1-BS1 cells and cav13 cells. Panels 4A to 4C show an important colocalization between SR-BI and caveolin-1 at the cell surface of Y1-

BSI cells. In cav13 cells (Panels 4D to 4F), although SR-BI is found mainly homogeneously distributed at the cell surface, caveolin-1 is not. Also, less colocalization was observed with cav13 than Y1-BSI cells, in accordance with our immunoprecipitation studies. We also investigated other lipoprotein receptors in cav13 cells. The confocal microscopy analysis shown in figure 5 reveals that LDLr and CD36 are also colocalized with caveolin-1 and to a greater extent than SR-BI. CD36 is known to localize in caveolae (Dorahy et al. 1996, Lisanti et al. 1994), but LDLr is normally found in clathrin coated pits. To analyze further this last phenomenon, HepG2 cell components were fractionated by sucrose gradients in the presence of carbonate and the fractions were analyzed for their caveolin-1, SR-BI, SR-BII, LDLr and clathrin levels (Figure 6). Figure 6B shows that in cav13 cells, caveolin-1 is mainly found in low buoyant density fractions (fractions 4-6), thus in fractions commonly referred to as low-density membrane rafts or caveolin-rich membranes. Overall, this figure shows that caveolin-1 expression does not significantly modify SR-BI localization which is mainly associated with low-density fractions in both cells. However, in light of our immunoprecipitation and confocal analyses, it is likely that some SR-BI moved from rafts to caveolae in cav13 cells. Differently, SR-BII was found in high density fractions in both hepatic subtypes (control and cav13 cells). This intracellular localization is in agreement with findings of Eckhardt et al. (2004). As for LDLr, it is mainly found associated with low-density fractions, which is in accordance with a recent finding of Ness et al. (2003) and apparently a feature of the hepatic cell. However, differently from them, we were able to detect clathrin in caveolin-1 containing fractions although less than in high-density fractions.

*Assessment of the effect of caveolin-1 expression on activities attributed to caveolin-1/caveolae.* The presence of caveolin-1 in the plasma membrane of HepG2 cells expressing caveolin-1 suggests that the formation of caveolae indeed occurs. We investigated the propensity of those cells to take up BSA as it has been demonstrated, by Schubert et al. (2001), that endothelial cells of caveolin-1 deficient mice (complete lack of caveolae) are defective in the uptake and transport of albumin. Figure 7A shows that the uptake of <sup>125</sup>I-BSA in HepG2 cells expressing caveolin-1 was increased by 40% ( $p < 0.01$ ) in cav9 cells and by 36% ( $p < 0.05$ ) in cav13 cells when compared to control cells. Therefore, when caveolin-1 is expressed in HepG2 cells, the uptake of albumin is increased. Caveolin-1 was also shown to

promote cholesterol efflux (Matveev et al. 2001, Frank et al. 2001A, Wang et al. 2003). Thus, cells were loaded with [<sup>3</sup>H]-cholesterol and their ability to efflux this cholesterol to HDL<sub>3</sub> was evaluated. Figure 7B indicates that caveolin-1 expression in HepG2 cells enhances efflux by 25% and 57% (p<0.05), in cav9 and cav13 cells respectively when compared to control cells. Many studies demonstrated that SR-BI (Ji et al. 1997), Wang et al. 2003) and ABCA1 (Lawn et al. 1999, Wang et al. 2001) have an important effect on cholesterol efflux. We therefore measured the level of expression of SR-BI and ABCA1 in our different subtypes of HepG2 cells. No significant difference was observed in the abundance of expression of these proteins (figure 8). Moreover, it is known that HepG2 cells, a hepatic cell line, can produce and secrete apoA-I (Sviridov et al. 1995) and apoE (Ji et al. 1994), which may promote cholesterol efflux from cells. Our results demonstrate that there is no significant difference between control cells, cav9 cells and cav13 cells in secreting apoA-I (100±15% vs 111±11% and 119±6%, mean±SEM, n=4). Secretion of apoE shows a significant decrease of 27±5% (p<0.05; n=4) in cav9 cells, while the level of expression does not differ between cav13 cells and control cells (100±7% vs 103±3%; n=4). Altogether, the observed change in cholesterol efflux is not related to the secretion of apoA-I or apoE, expression of SR-BI or ABCA1. Thus, caveolin-1 expression in HepG2 cells lead to plasma membrane caveolae that are functional.

*Assessment of the effect of caveolin-1 expression on lipoprotein metabolism.* Our next goal was to define if the expression of caveolin-1 in HepG2 cells would affect the ability of HepG2 cells to bind LDL and HDL<sub>3</sub> (figure 9). The specific binding of <sup>125</sup>I-LDL was reduced marginally by 12% (p<0.10) and significantly by 27% (p<0.05) in cav9 and cav13 cells, respectively when compared to control cells. On the other hand, <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub> binding was increased significantly by 28% (p<0.05) and marginally by 35% (p<0.10) in cav9 and cav13 cells, respectively when compared to control cells. Thus, caveolin-1 expression in HepG2 cells increases the binding from HDL and reduces that from LDL. Surprisingly, our data indicate that the specific degradation of 20 µg/ml of <sup>125</sup>I-LDL in HepG2 cells expressing caveolin-1 was increased by 91% (p<0.10) in cav9 cells and by 144% (p<0.05) in cav13 cells when compared to control cells (figure 9). Similar results were obtained at 50 µg/ml of <sup>125</sup>I-LDL. This cannot be attributed to an increase in LDLr expression in HepG2 cells expressing

caveolin-1 as none was observed (figure 8), however, using the LDLr blocking antibody IgG-C7 as in (Charest et al. 1999), we found that more than 80% of the degradation activity is due to LDLr (data not shown) in both normal and cav13 cells. Thus, the expression of caveolin-1 in HepG2 cells increases the degradation of LDL even though LDL binding is reduced. These experiments were not conducted on HDL since HepG2 cells degrade them poorly.

HDL-CE and LDL-CE selective uptake was quantified in the different subtypes of HepG2 cell. Figure 10A shows that while  $^{125}\text{I}$ -HDL<sub>3</sub>-protein and  $^{125}\text{I}$ -LDL-protein cell associations were similar in control, cav9 and cav13 cells,  $^3\text{H}$ -CE-LDL cell association was significantly reduced by 43% and 59% ( $p < 0.05$ ) in cav9 and cav13 cells, respectively when compared to control cells (figure 10B). On the other hand,  $^3\text{H}$ -CE-HDL<sub>3</sub> cell association was significantly increased by 25% and 43% ( $p < 0.05$ ) in cav9 and cav13 cells respectively (figure 10B). Analysis of the CE-selective uptake (CE association minus protein association) reveals that LDL-CE-selective uptake was decreased by 58% and 73% ( $p < 0.05$ ) in cav9 and cav13 cells respectively (figure 10C), while HDL-CE selective uptake was increased by 38% and 56% ( $p < 0.05$ ), respectively in cav9 and cav13 cells when compared to control cells. As for LDL, degradation (holoparticle uptake) is detectable and increased upon caveolin-1 expression; therefore, values can be generated also by removing these data from the CE selective uptake association. This type of assessments accentuates the effect of caveolin-1 expression on LDL-CE selective uptake by another 8% and indicates that the rise in degradation does not compensate completely for the loss of CE-selective uptake. Figure 8 reveals that this cannot be attributed to an increase in SR-BI or SR-BII expression in HepG2 cells expressing caveolin-1. The same conclusion was reached for CD36 (data not shown). These data clearly indicate that LDL and HDL<sub>3</sub> are affected in a different manner when caveolin-1 is expressed in HepG2 cells. Recently, we showed (Rhains et al. 2004) that perturbation of HepG2 cell membrane raft structure with cholesterol oxidase and sphingomyelinase similarly decreases LDL-CE selective uptake and increases HDL-CE selective uptake. As an increase of selective uptake from HDL was recently demonstrated by Reaven et al. (2004) when SR-BI is in a dimeric form, we looked for possible SR-BI dimerization in normal HepG2 cells treated or not with cholesterol oxidase and sphingomyelinase and in cav13 cells. Indeed, figure 11 (panels A and B) shows that the enzyme treatment increases the level of SR-BI dimers in



HepG2 cells. Moreover, it has been shown that SR-BII could also be found as dimers in murine models (Reaven et al. 2004). In figure 11 (panel C), when caveolin-1 is expressed in HepG2 cells, the dimeric form of SR-BI is more abundant (monomer/dimer = 22.2 for control cells vs 6.7 for cav13 cells,  $p < 0.005$ ) while no difference was observed in SR-BII dimerization. Thus, either disturbing rafts or expressing caveolin-1 in HepG2 cells favors the dimeric form of SR-BI which correlates with higher and lower CE-selective uptake from HDL and LDL, respectively.

## DISCUSSION

Our work demonstrates that HepG2 cells do not express a detectable level of caveolin-1 when membrane proteins are solubilized with octyl glucoside or isolated by a non-detergent procedure. This is in accordance with previous studies (Fujimoto et al. 2001, Fu et al. 2004) that also showed the lack of caveolin-1 in those cells. This does not mean that HepG2 cells are totally deficient in caveolin-1 since Pohl et al. (2002) were able to detect this protein following a procedure leading to total cell proteins. Also, by fractionating HepG2 cell proteins on sucrose gradients in presence of carbonate, our group (Rhainds et al. 2004) recently showed that although no caveolin-1 is found in fractions corresponding to lipid rafts/caveolae, it is detectable in fractions corresponding to cytosolic proteins. Likewise, by confocal microscopy we found that caveolin-1 is slightly expressed but it is mainly retained in the perinuclear area (data not shown). The reason why caveolin-1 is totally absent at the membrane of HepG2 cells remains obscure but provided us with a perfect cell system in which it was possible to create caveolae in order to establish the effect of hepatic caveolin-1/caveolae on LDL and HDL<sub>3</sub> metabolism. Since our stable transformants expressing caveolin-1 show this protein at the surface, it can be deduced that a minimal amount of caveolin-1 is required for its plasma membrane localization. Furthermore, based on our BSA uptake assay, the caveolae of our transformant cells appear functional.

The evidence for a role of caveolin-1 in the efflux of FC has been debated (Matveev et al. 2001, Frank et al. 2001A, Frank et al. 2002, Wang et al. 2003, Fielding & Fielding 1995C, Bist et al. 1997, Pol et al. 2001, Mendez et al. 2001). In our study, we have shown that the expression of caveolin-1 in HepG2 cells increases the efflux of cell cholesterol mediated by HDL<sub>3</sub> without changing the levels of SR-BI or ABCA1, two mediators of cellular cholesterol efflux. It is therefore tentative to speculate that caveolin-1 contributes directly to cholesterol efflux mediated by HDL<sub>3</sub>. Our results are in accordance with a very recent report by Fu et al. (2004) who concluded that caveolin-1 in HepG2 cells enhances cholesterol efflux to plasma and purified apoA-I by enhancing transfer of cholesterol to cholesterol-rich domains of plasma membrane. Thus, our study extends their findings to HDL mediated cholesterol

efflux. Alternatively, increased selective HDL-CE uptake upon caveolin-1 expression may generate smaller HDL with an enhanced affinity or ability to associate cellular cholesterol.

Our results showed that LDL degradation is more efficient when HepG2 cells express caveolin-1. This did not correlate with an increase of LDLr levels in caveolin-1 expressing cells. As LDLr is normally considered to be associated with clathrin-coated pits (Anderson et al. 1977), we were not expecting that caveolin-1 expression would affect its activity. However, our confocal microscopy and cell fractionation analysis revealed that caveolin-1 is partially colocalized with LDLr. This is in agreement with a recent study (Ness et al. 2003) showing that in liver homogenates from hamsters and rats, the fractions with the highest concentrations of LDLr coincide with the presence of caveolin-1. The authors concluded that rodent hepatic LDLr is mainly localized in caveolae. Our results indicated that LDLr of HepG2 cells is localized above all in low buoyant density fractions when caveolin-1 is expressed or not. We have also detected clathrin in those fractions. We cannot explain why caveolin-1 expression favors LDL degradation but the finding surely deserves further investigation. We found as well that CD36 and caveolin-1 are quite colocalized in our cells expressing caveolin-1, in accordance with reports on lung tissue and adipocytes (Lisanti et al. 1994, Souto et al. 2003). Since CD36 can also bind LDL (Calvo et al. 1998), it is possible that the close association between caveolin-1, LDLr and CD36 favors uptake and degradation of LDL.

We have shown for the first time that caveolin-1 expression has opposite impacts on LDL and HDL<sub>3</sub> binding as it increases HDL<sub>3</sub> binding and reduces that of LDL. In HepG2 cells most of LDL and HDL binding is due to SR-BI (Rhainds et al. 2003), thus a simple modulation of the expression of SR-BI by caveolin-1 cannot explain the anti-parallel effect observed. Moreover, the same levels of SR-BI were found in normal and caveolin-1 expressing cells. In accordance with the binding studies, the expression of caveolin-1 in HepG2 cells increases the selective uptake of CE from HDL while it reduces that from LDL. Our study is the first one assessing the effect of caveolin-1 expression on LDL-CE selective uptake. Apparently, the expression of caveolin-1 modulates the activity of SR-BI to favor HDL-CE selective uptake but not LDL-CE selective uptake. Interestingly, we found that

caveolin-1 expression induces SR-BI dimerization in HepG2 cells, a phenomenon which has been shown to increase HDL-CE selective uptake in rat adrenal and ovary cells (Reaven et al. 2004). Our work therefore suggests that while SR-BI dimerization improves SR-BI ability of CE-selective uptake towards HDL, it reduces it towards LDL. This is also in agreement with our demonstration that SR-BI in normal lipid rafts instead of disturbed rafts shows an optimal activity towards LDL but not to HDL (Rhainds et al. 2004) and by our finding that this correlates also with more SR-BI dimers in disturbed rafts cells. Furthermore, we can rule out that our observations on CE-selective uptake relate to SR-BII since we showed that its level and extent of dimerization are not modified by caveolin-1 expression, and moreover it is mainly intracellular. Thus, we suggest that dimerization modifies SR-BI structure in a way that its HDL binding site is better exposed (or that its structure is optimal) and that of LDL is hidden (or shows a non-optimal structure). This is possible since it has been shown that LDL and HDL interact with different sites on SR-BI (Gu et al. 2000B), a concept supported later by Thuahnai et al. (2003). This possibility is also supported by our finding that the reduction in LDL-CE selective uptake is almost equivalent to the rise in HDL selective uptake.

In conclusion, our results demonstrate that cholesterol efflux, HDL-CE selective uptake and LDL degradation are increased upon the expression of caveolin-1 in HepG2 cells while LDL-CE selective uptake is diminished. This work is the first demonstration that the liver can play a dual role in the regulation of reverse cholesterol transport (RCT) by modulating the influx and efflux of cholesterol. At first sight, it appears that hepatic caveolin-1 expression would be anti-atherogenic by favoring HDL-CE selective uptake. However, the higher cholesterol efflux observed in hepatic cells could abolish this apparent beneficial effect of caveolin-1. The benefits of caveolin-1 expression can be seen when LDL degradation is increased, clearly an anti-atherogenic effect, but on the other hand the decrease of LDL-CE selective uptake observed cannot be interpreted since it is not yet known if this pathway is beneficial or not. It can be beneficial by reducing LDL cholesterol levels but may also give rise to small dense LDL particles that are highly atherogenic. Thus, other studies are required before we can say with certainty if favoring the formation of caveolae structure on hepatic cell can be beneficial.

## FIGURE LEGENDS

- Figure 1: Western blot analysis of caveolin-1 levels in HepG2 cells, liver mouse tissue, Y1-BS1 cells and normal human skin fibroblasts (hFb). Cells were solubilized as described in the Materials and Methods and different amounts of protein were subjected to 12% SDS-PAGE. The expression of caveolin-1 was detected after transfer to nitrocellulose using a polyclonal antibody. Representative data from one of three independent experiments.
- Figure 2: Detection of caveolin-1 transcript and protein in different subtypes of HepG2 cells. A) Caveolin-1 RT-PCR products from total RNA (tRNA) and messenger RNA (mRNA) in different subtypes of HepG2 cells. B) Western blot analysis of caveolin-1 levels in different subtypes of HepG2 cells. Cells were solubilized with a lysis buffer (buffer D) and proteins (50  $\mu$ g) were subjected to 12% SDS-PAGE. The expression of caveolin-1 was detected after transfer to nitrocellulose using a polyclonal IgG or a monoclonal IgG antibody, as described in Materials and Methods. Each result represents the mean percentage  $\pm$  SEM of one of five independent experiments.
- Figure 3: Subcellular fractionation of different subtypes of HepG2 cells and Y1-BS1 cells. Equal amounts of protein (20  $\mu$ g) were used from CL, PNS, PM and CM. Each of these samples from control (panel A), cav13 (panel B) and Y1-BS1 cells (panel C) was separated on 12% SDS-PAGE, blotted and immunodetected with anti-SR-BI IgG and anti-caveolin IgG. In panel D, CM fraction of HepG2 cells expressing caveolin-1 (cav13) was immunoprecipitated with anti-caveolin-1 antibody, and the supernatant (S) or immunoprecipitate (IP) was separated by 12% SDS-PAGE and analyzed by western blot for SR-BI and caveolin-1. Representative data from one of three independent experiments.

- Figure 4: Immunofluorescence analysis of Y1-BSI cells and HepG2 cells expressing caveolin-1. Cells were fixed and incubated with both anti-SR-BI rabbit polyclonal and anti-caveolin-1 mouse monoclonal antibodies, followed by Alexa 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa 546 goat anti-mouse IgG. The SR-BI fluorescence is shown in A and D, the caveolin-1 fluorescence is shown in B and E, and the merged images are shown in C and F. Representative data from one of three independent experiments (scale bars, 10  $\mu\text{m}$ ).
- Figure 5: Colocalization of caveolin-1 and LDLr or caveolin-1 and CD36 in HepG2 cells expressing caveolin-1. Cells were fixed and incubated with both anti-LDLr rabbit polyclonal (A) and anti-caveolin-1 mouse monoclonal (B) antibodies or anti-caveolin-1 rabbit polyclonal (D) and anti-CD36 mouse monoclonal FA6-152 (E) antibodies, followed by Alexa 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa 546 goat anti-mouse IgG. The merged images are shown in C and F. Representative data from one of three independent experiments (scale bars, 50  $\mu\text{m}$ ).
- Figure 6: Immunoblotting of control (A) and caveolin-1 expressing HepG2 cell (B) proteins fractionated by discontinuous sucrose gradient. Cell proteins were fractionated with detergent-free sodium carbonate discontinuous 5-40% sucrose gradients as described under Materials and Methods. The twelve gradient fractions were concentrated with TCA and 100  $\mu\text{l}$  sample of each fraction was loaded on 10% reducing SDS-PAGE. After transfer on nitrocellulose, proteins were immunoblotted and detected by enhanced chemiluminescence for SR-BI, SR-BII, caveolin-1, LDLr and clathrin. The images are representative of three independent experiments.
- Figure 7: BSA uptake and cholesterol efflux. A) Uptake of  $^{125}\text{I}$ -BSA (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on HepG2 cells transfected with the vector pRc/CMV without insert (control cells) and HepG2 cells expressing caveolin-1, cav9 cells (n=11) and cav13 cells (n=6). Control cell value (in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  of cell protein) in each experiment

was set as 100%. B) Efflux of [ $^3\text{H}$ ] cholesterol to HDL<sub>3</sub> (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on HepG2 cells transfected with the vector pRc/CMV without insert (control cells) and HepG2 cells expressing caveolin-1, cav9 cells and cav13 cells (n=4). Each result represents the mean percentage  $\pm$  SEM of the number of experiments indicated in parentheses each conducted in triplicate.

\*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the results obtained with control cells.

\*\* Significantly different ( $p < 0.10$ ) from the results obtained with control cells.

Figure 8: Western blot analysis of ABCA1, LDLr, SR-BI, SR-BII and  $\beta$ -actin levels in different subtypes of HepG2 cells. Cells were obtained as described in Materials and Methods and 50  $\mu\text{g}$  of protein were analyzed by 8% SDS-PAGE for the detection of ABCA1, LDLr, SR-BI, SR-BII, or  $\beta$ -actin. Representative data from one of three independent experiments.

Figure 9: HDL<sub>3</sub> binding, LDL binding and LDL degradation. Binding of  $^{125}\text{I}$ -LDL or  $^{125}\text{I}$ -HDL<sub>3</sub> (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or on HepG2 cells transfected with the vector pRc/CMV without insert (control cells) and HepG2 cells expressing caveolin-1, cav9 cells (n=8) and cav13 cells (n=4). Degradation of  $^{125}\text{I}$ -LDL (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on HepG2 cells transfected with the vector pRc/CMV without insert (control cells) and HepG2 cells expressing caveolin-1, cav9 cells and cav13 cells (n=5). Control cells value (in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  of cell protein) in each experiment was set as 100%. Each result represents the mean percentage  $\pm$  SEM of the number of experiments indicated in parentheses each conducted in triplicate.

\*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the results obtained with control cells.

\*\* Significantly different ( $p < 0.10$ ) from the results obtained with control cells.

Figure 10: LDL-CE and HDL<sub>3</sub>-CE selective uptake. Association of <sup>125</sup>I-LDL or <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub> (20 μg/ml) (A), association of <sup>3</sup>H-CE-LDL or <sup>3</sup>H-CE-HDL<sub>3</sub> (B) and selective uptake (C) by HepG2 cells transfected with the vector pRc/CMV without insert (control cells) and HepG2 cells expressing caveolin-1, cav9 cells and cav13 cells. Each result represents the mean ± SEM of four experiments each conducted in triplicate.

\*Significantly different (p<0.05) from the results obtained with control cells.

Figure 11: SR-BI/BII immunoblotting of control treated or not with cholesterol oxidase and sphingomyelinase and of caveolin-1 expressing HepG2 cell proteins fractionated by discontinuous sucrose gradient. Cell proteins were fractionated with detergent-free sodium carbonate discontinuous 5-40% sucrose gradients as described under Materials and Methods. The fractions were concentrated with TCA and 100 μl sample of each fraction was loaded on 8% reducing SDS-PAGE. After transfer on nitrocellulose, proteins were immunoblotted for SR-BI and detected by enhanced chemiluminescence: Panel A, control HepG2 cells; Panel B, control HepG2 cells preincubated with cholesterol oxidase (COase) at 1 U/ml and sphingomyelinase (SMase) at 0.5 U/ml for 1 hour at 37°C, Panel C, control HepG2 cells or cav13 cells from fraction 4 (SR-BI) or fraction 9 (SR-BII). The images are representative of three independent experiments.



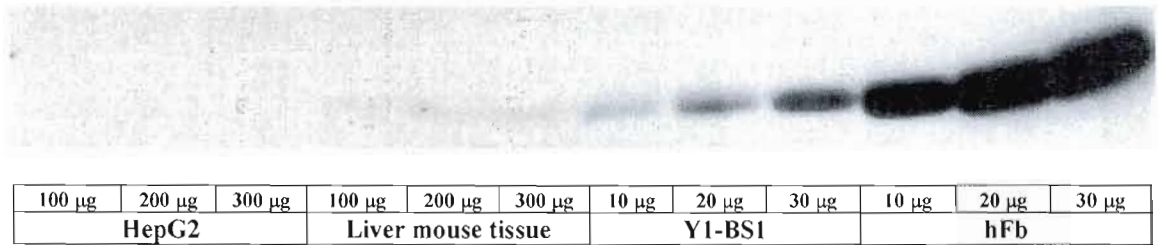
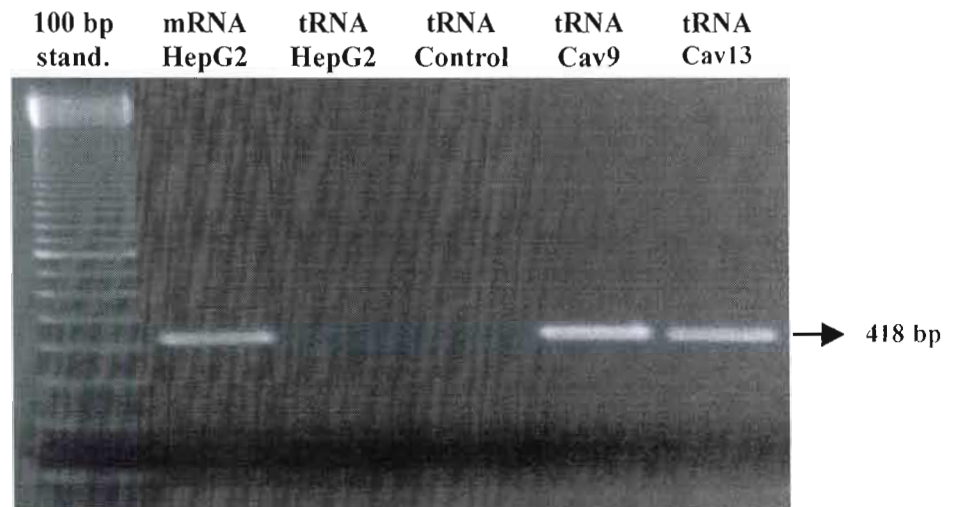


Figure 1

## A) RT-PCR



## B) Western Blotting

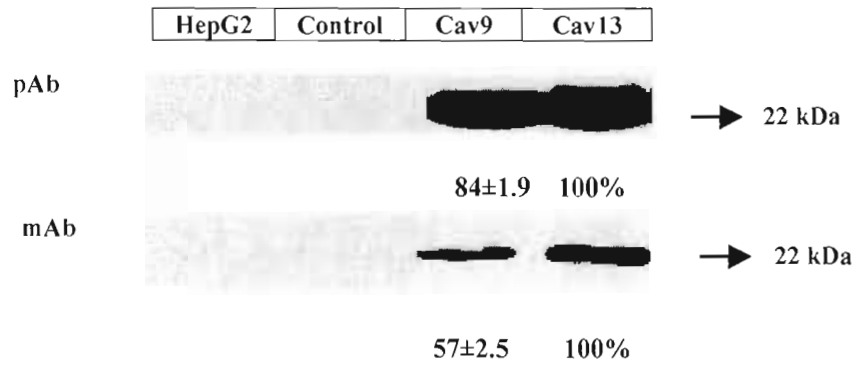


Figure 2

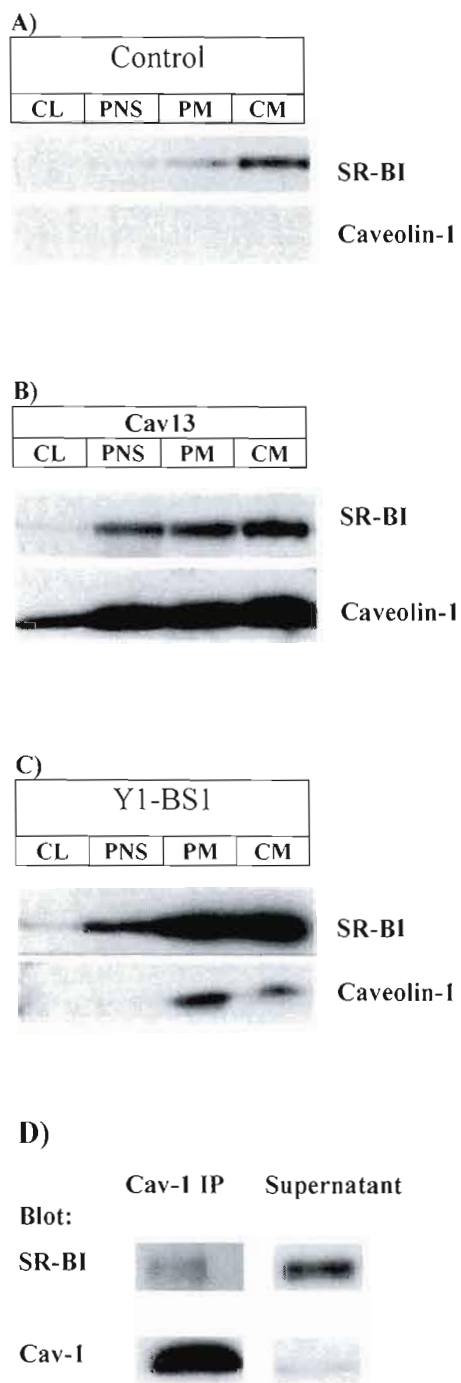


Figure 3

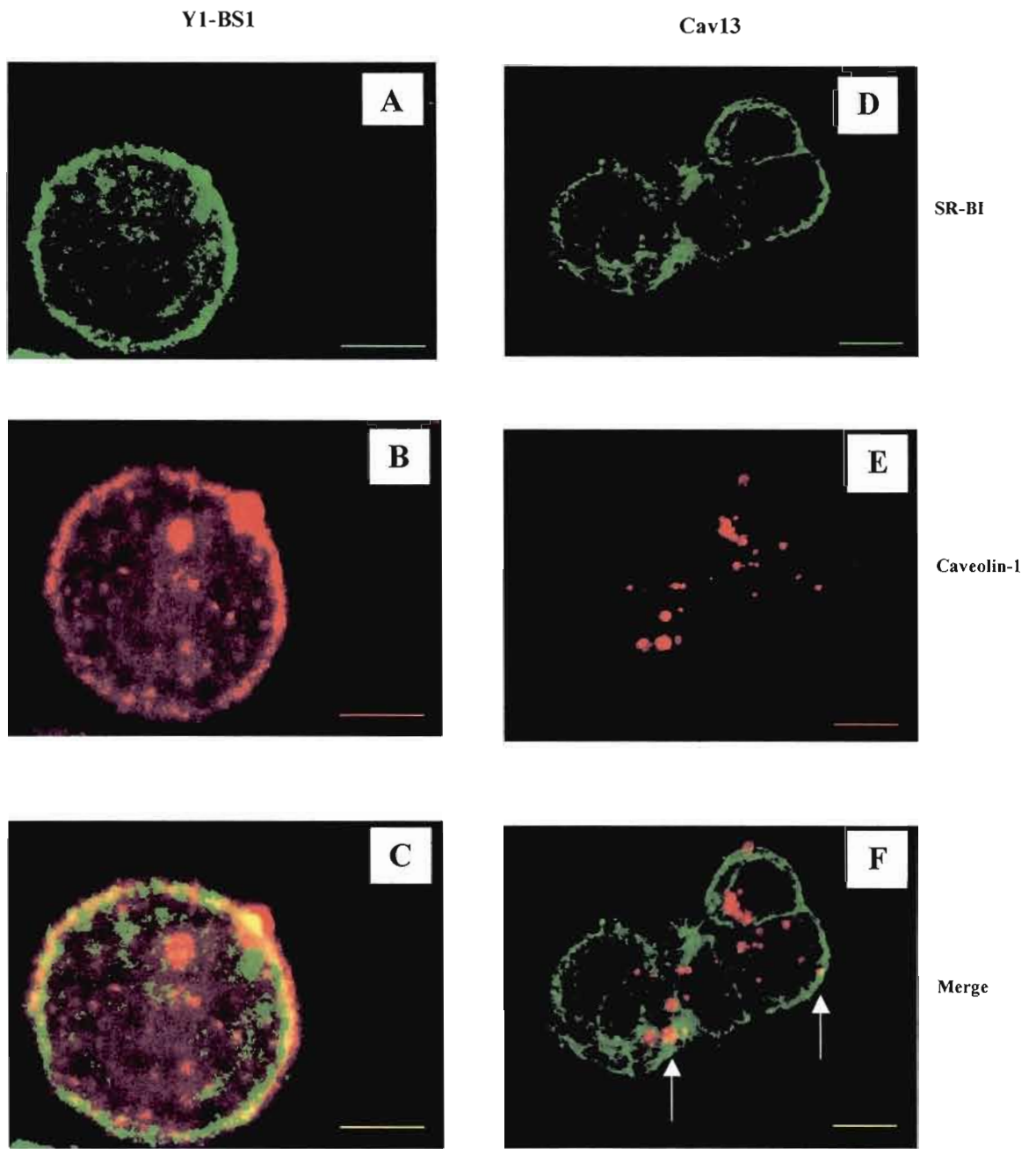


Figure 4

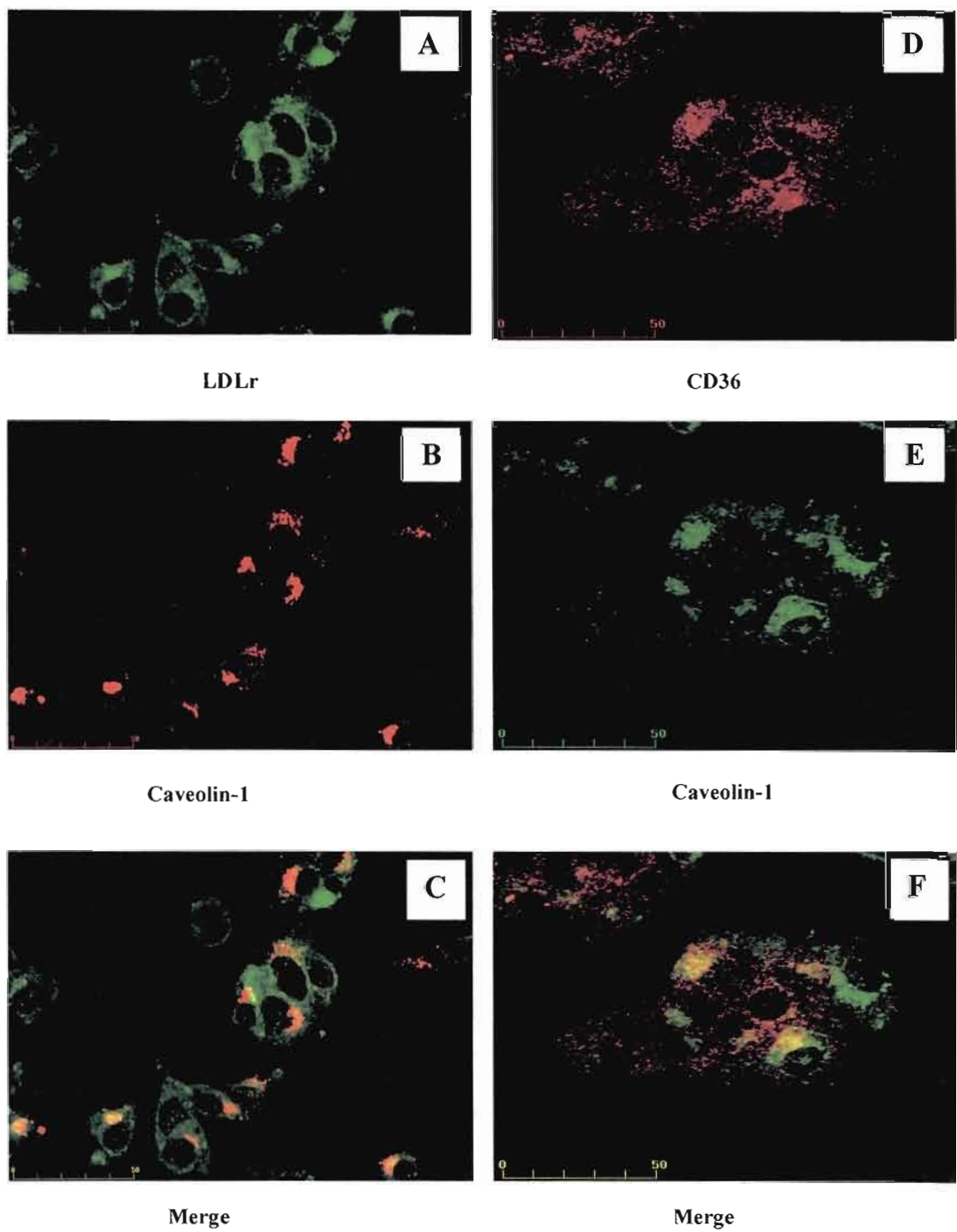
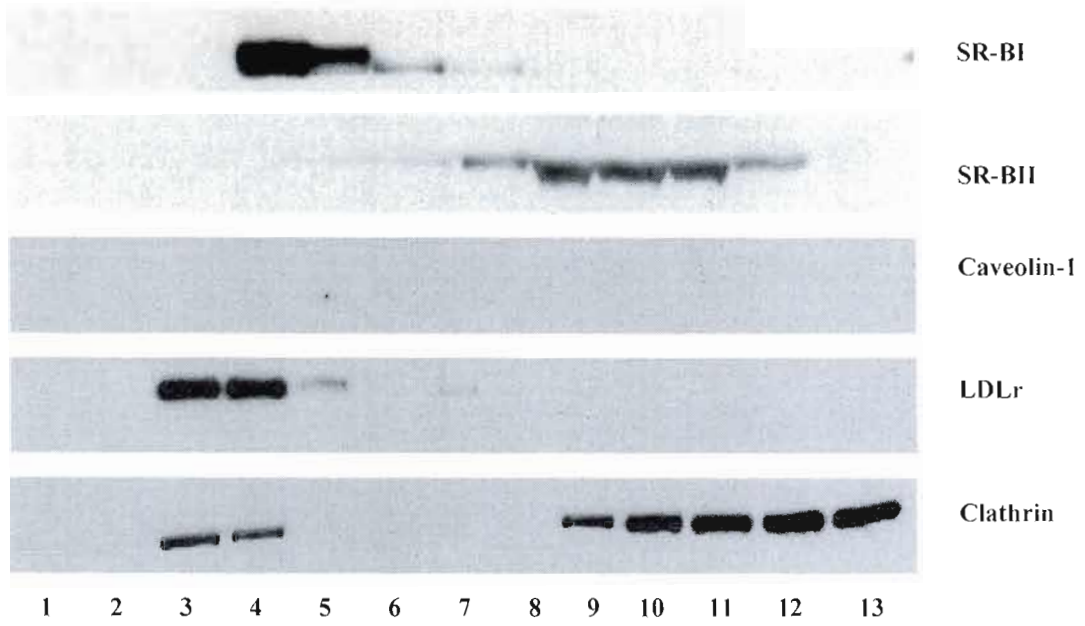


Figure 5

## A) Control



## B) Cav13

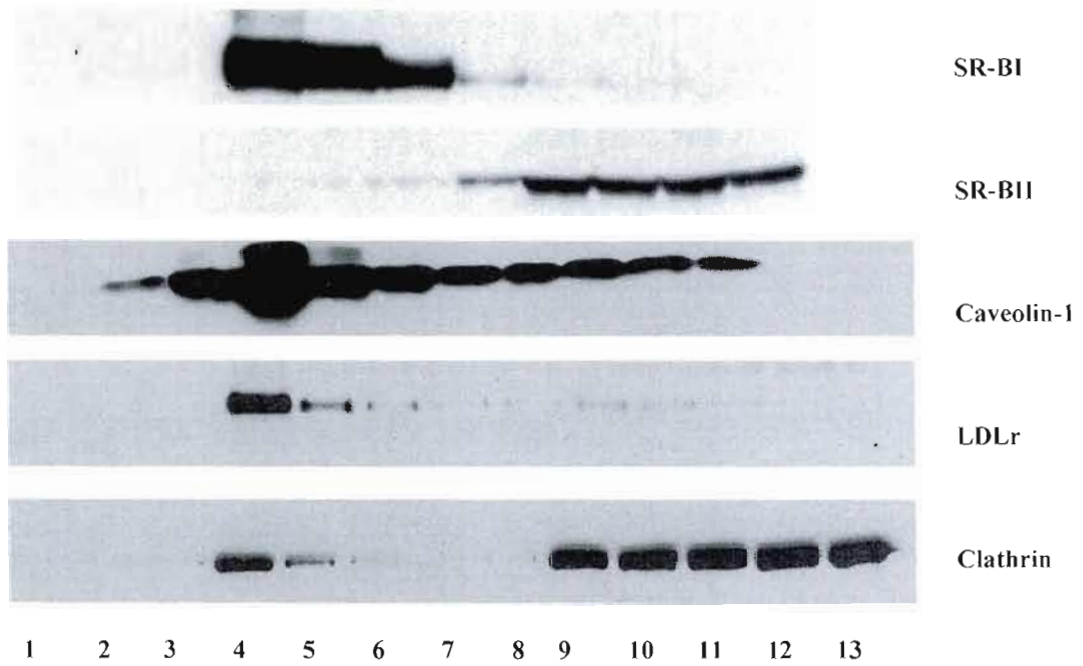


Figure 6

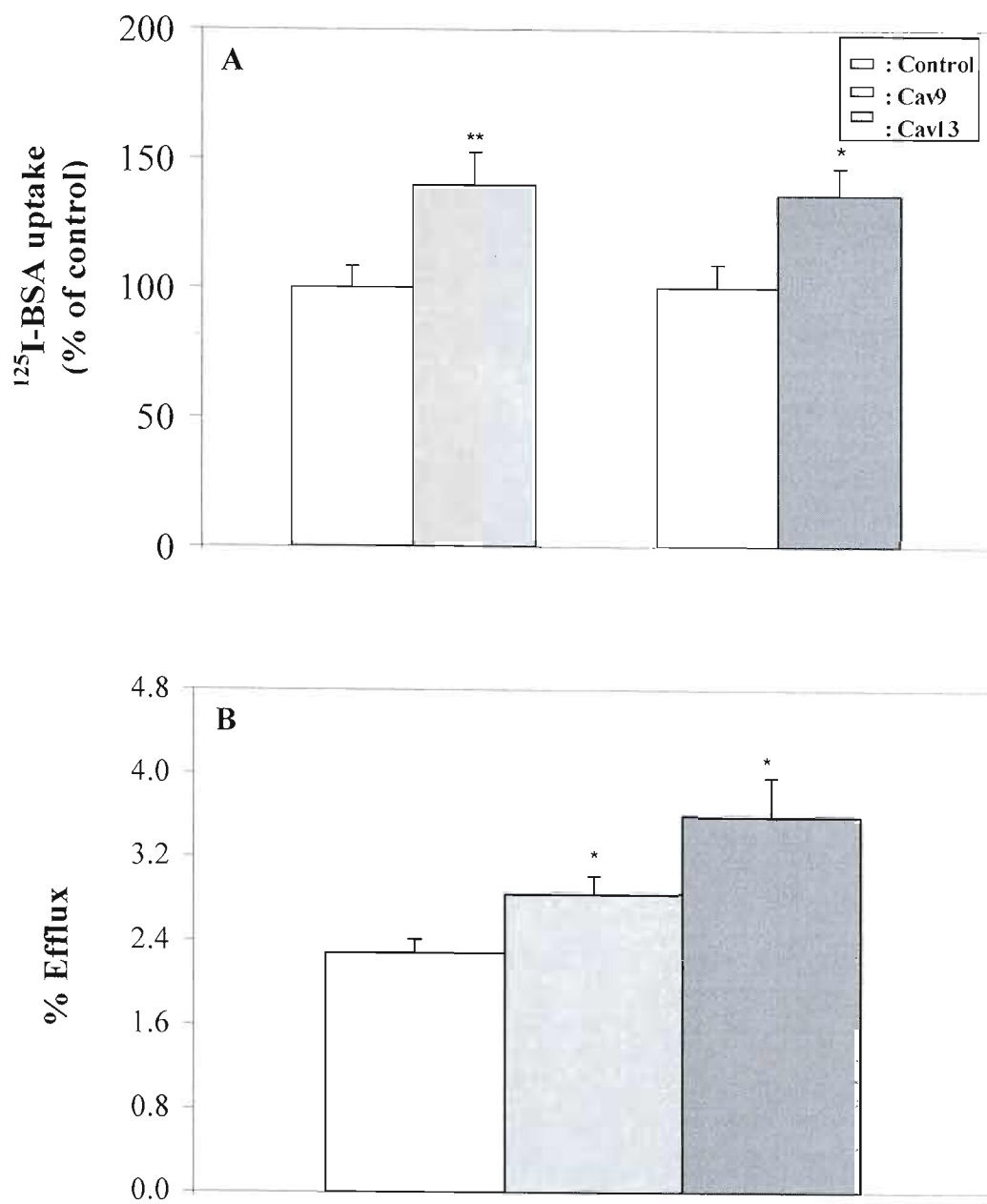


Figure 7

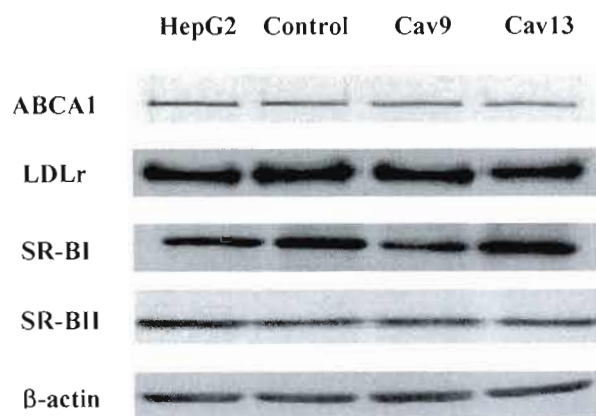


Figure 8



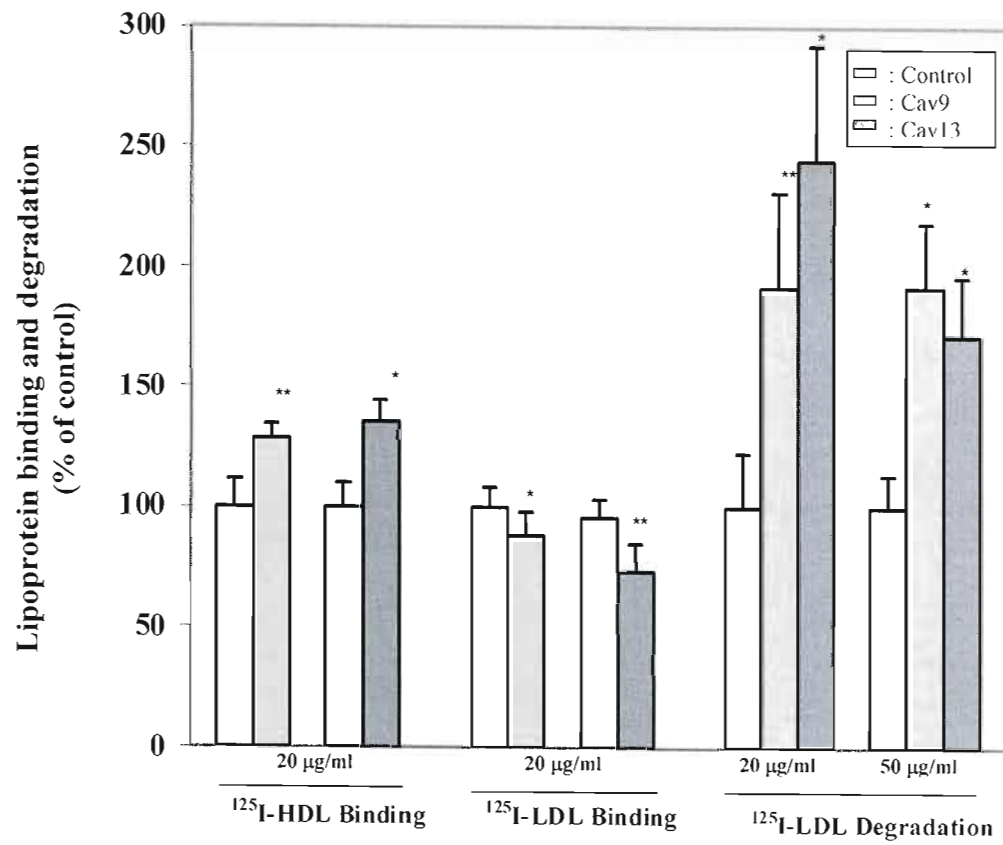


Figure 9

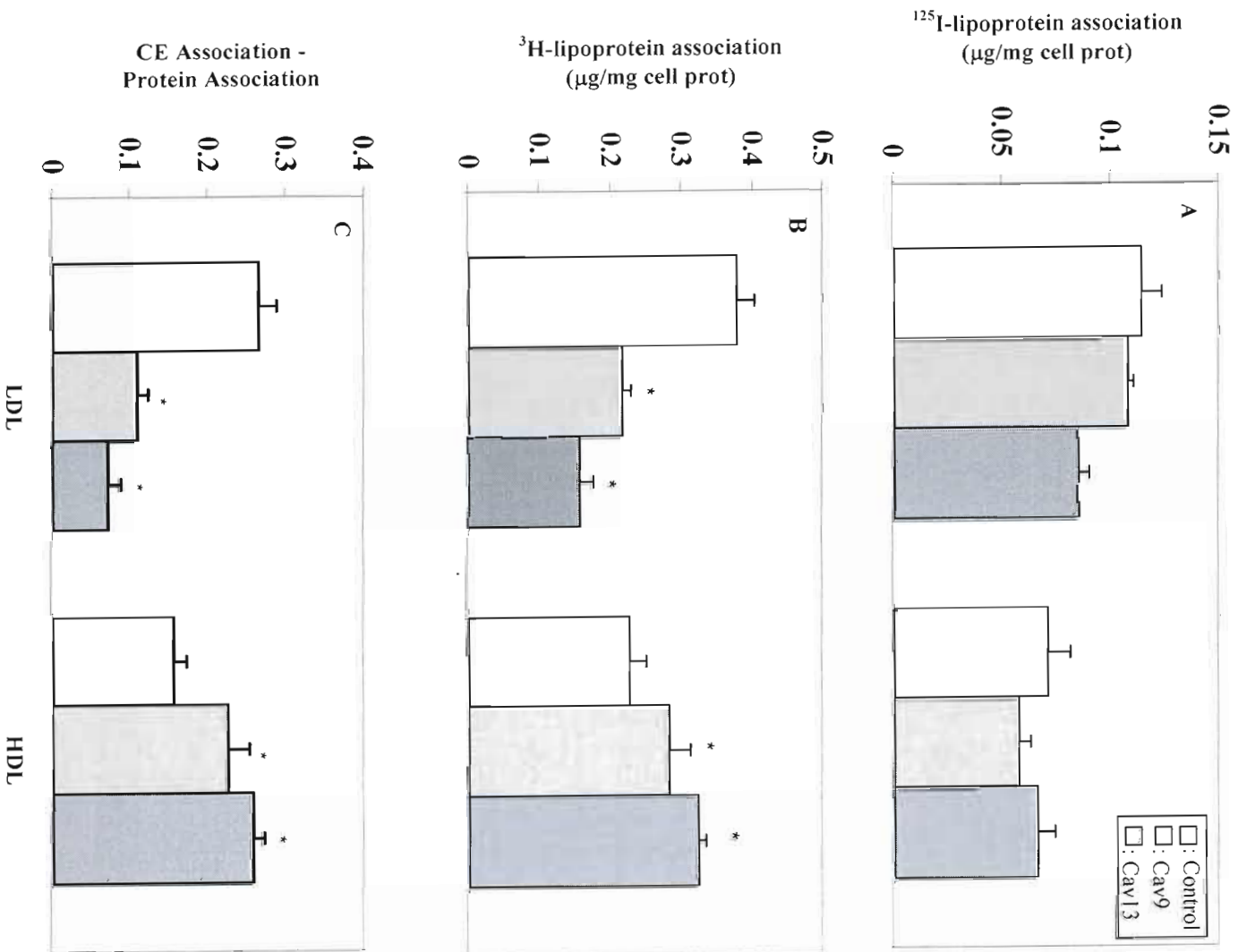


Figure 10

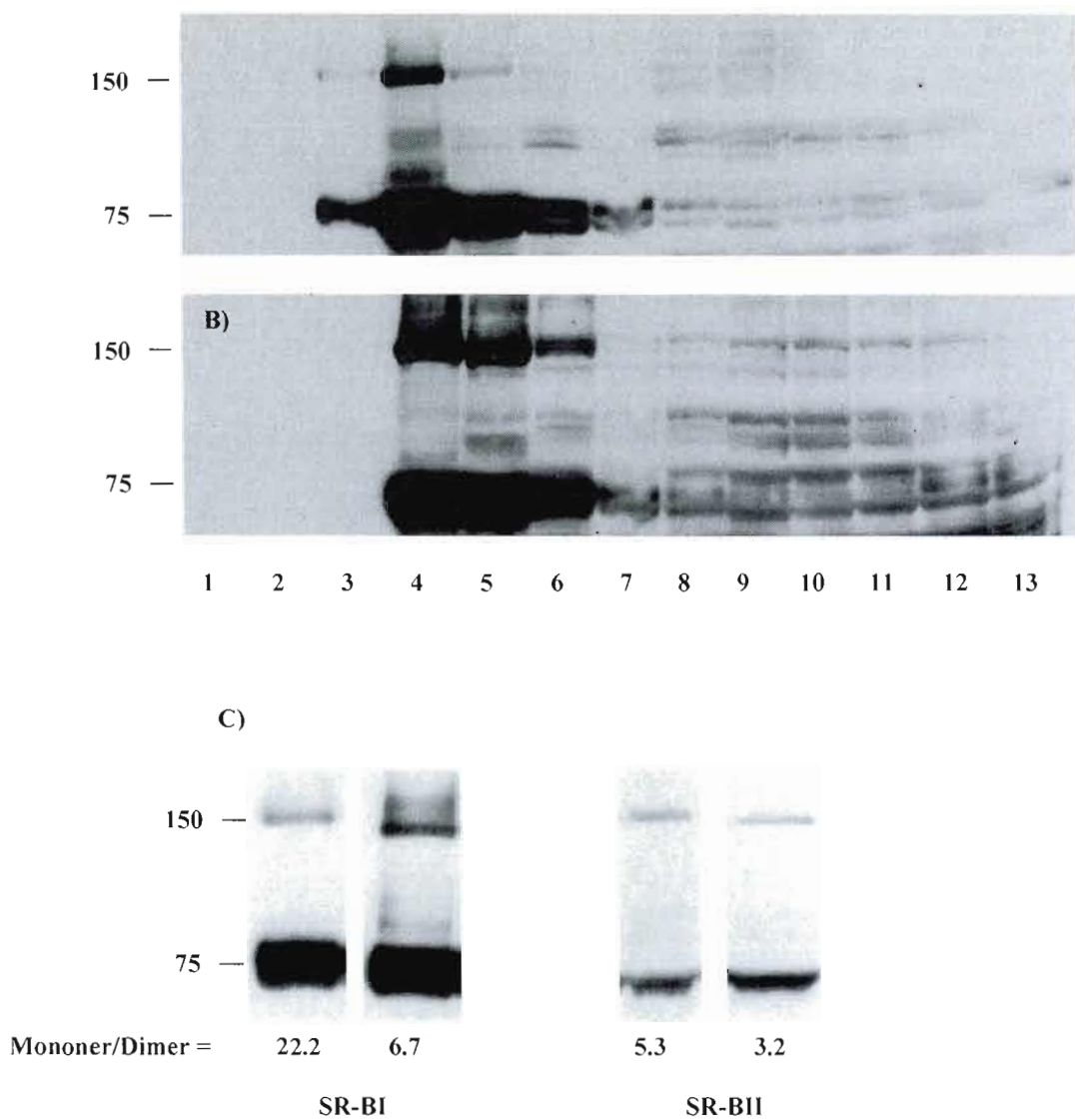


Figure 11

CHAPITRE 4:

Scavenger Receptor Class B Type I, Cluster of Differentiation 36 and Caveolin-1  
Contribute Positively to Cholesterol Efflux in Hepatic Cells

En préparation

Scavenger Receptor Class B Type I, Cluster of Differentiation 36 and Caveolin-1 Contribute  
Positively to Cholesterol Efflux in Hepatic Cells†

To Quyen Truong<sup>a\*</sup>, Dominique Aubin<sup>a</sup>, Louise Falstra<sup>a</sup>, Vilayphone Luangrath<sup>a</sup>, Mathieu  
R. Brodeur<sup>a</sup>, David Rhainds<sup>b</sup> and Louise Brissette<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal,  
Québec, Canada H3C 3P8

<sup>b</sup> Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

\* To whom correspondence should be addressed:

To Quyen Truong or Louise Brissette  
Département des Sciences Biologiques  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succursale Centre-ville  
Montréal, Québec  
Canada H3C 3P8

Tel: (514) 987-3000 ext. 4368 or 6592

Fax: (514) 987-4647

E-mail: [truong.to\\_quyen@courrier.uqam.ca](mailto:truong.to_quyen@courrier.uqam.ca) (T.Q. Truong), [brissette.louise@uqam.ca](mailto:brissette.louise@uqam.ca) (L. Brissette)

RUNNING TITLE: CHOLESTEROL EFFLUX IN HEPATIC CELLS

## ABSTRACT

In non hepatic cells, scavenger receptor class B type I (SR-BI), cluster of differentiation 36 (CD36) and caveolin-1 were described as mediators of cholesterol efflux, the first step of reverse cholesterol transport. Experiments were firstly conducted with the human hepatoma, HepG2. Stable transformants of HepG2 cells overexpressing SR-BI, CD36 or caveolin-1 were generated, as well as cells overexpressing both caveolin-1 and SR-BI or caveolin-1 and CD36 in order to address the effect of caveolin-1 on both receptor activities. These cells were analyzed for their ability to efflux cholesterol to HDL<sub>3</sub>. Our results show that overexpressing SR-BI, CD36 or caveolin-1 increases cholesterol efflux by 106%, 92% and 48% respectively. Moreover, the dual overexpression of caveolin-1 and SR-BI or caveolin-1 and CD36 lead to a more prominent increase in cholesterol efflux. Efflux studies were also conducted with primary cultures of SR-BI knockout (KO), CD36 KO and SR-BI/CD36 double-KO (dKO) mice. SR-BI KO and SR-BI/CD36 dKO hepatic cells show 41% and 56% less cholesterol efflux respectively than normal hepatic cells. No significant difference was observed between the efflux of normal and CD36 KO cells. The difference between the role of human and murine CD36 correlated with the absence of CD36 dimers in mouse caveolae/rafts. Altogether, our results show that SR-BI is clearly involved in cholesterol efflux in mouse and human hepatic cells, while CD36 plays a significant role in human cells.

Key words: SR-BI, CD36, caveolin-1, cholesterol efflux, mouse, human, hepatic cells.

## INTRODUCTION

In 1968, John Glomset (1968) proposed that lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) and HDL might be anti-atherogenic and postulated a mechanism for the transport of cholesterol from membranes of peripheral cells to the liver for excretion into the bile, which is now referred to as reverse cholesterol transport (RCT). Following his hypothesis, several studies have shown an inverse correlation between the development of coronary artery diseases and RCT. The first step of RCT is cholesterol efflux, a movement of free cholesterol (FC) and phospholipid from the plasma membrane to extracellular acceptors such as HDL. Currently reported mechanisms of cholesterol efflux include aqueous diffusion to a phospholipid-containing acceptor (Johnson et al. 1991), scavenger receptor class B (SR-B) mediated efflux, ATP-binding cassette transporter (ABC) A1 (ABCA1), as well as ABCG1 mediated efflux. ABCA1 preferentially mediates the flux of FC to small pre $\beta$ -HDL and lipid-poor apolipoproteins (apo) such as apoA-I, apoE, and apoA-IV (Bortnick et al. 2000), while ABCG1 can mediate cholesterol efflux to HDL but not to lipid-free apoA-I (Wang et al. 2004, Kennedy et al. 2005). SR-B type I (SR-BI) preferentially mediates the flux of FC to larger phospholipid-rich HDL (Bortnick et al. 2000). SR-B of type II (SR-BII) an alternative spliced product of the SR-BI gene, can also mediate cell cholesterol efflux but with low efficiency (Webb et al. 1998). Another member of the scavenger receptor of class B family (Krieger 1999) sharing a 32% sequence homology with SR-BI and known as the cluster of differentiation-36 (CD36) was shown to mediate efflux (Parathath et al. 2004).

SR-BI and CD36 are expressed in steroidogenic organs and the liver in both rodents and humans (Acton et al. 1996, Landschultz et al. 1996, Cao et al. 1997). SR-BI and CD36 bind both native and modified lipoproteins. The former receptor is clearly involved in cholesteryl ester selective uptake from both HDL (Acton et al. 1996) and LDL (Swarnakar et al. 1999). It was first demonstrated that both receptors were localized in caveolae (Babitt et al. 1997, Lisanti et al. 1994) but recently these reports have been contradicted by many authors who have shown that they reside in another compartment and not associated with caveolin-1 (Peng et al. 2004, Zeng et al. 2003, Truong et al. 2006). Caveolae and lipid rafts are rich in free cholesterol (FC) and glycosphingolipids (Brown & Rose 1992) and characterized by their

resistance to detergent extraction at 4<sup>0</sup>C (Kurzchalia et al. 1992) and their light density on sucrose gradients (Smart et al. 1995). In non-muscle cells, caveolin-1 is the major protein of caveolae. This integral membrane protein of 22-kDa showing a hairpin-loop structure in the lipid bilayer, binds specifically to cholesterol (Murata et al. 1995) and facilitates transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane (Smart et al. 1996). Additionally, it has been demonstrated that caveolin-1 can mediate cellular cholesterol efflux to plasma (Fielding & Fielding 1996).

The hepatic cholesterol efflux had been poorly studied as in conjunction with the RCT theory, it was commonly accepted that efflux was a matter of extrahepatic cells. However, as reviewed recently by Lewis and Rader (2005), evidences are emerging that a large part of the pool of cholesterol effluxed from cells comes from the liver. Indeed, when overexpressed in mouse liver, ABCA1 was shown to be a major source of HDL-cholesterol (Basso et al. 2003). Our aim was to define the contribution of hepatic SR-BI and CD36 in cholesterol efflux. Moreover, as both receptors are found in hepatocytes expressing a very low level of caveolin-1 (Truong et al. 2006, Fu et al. 2004) and caveolae were suggested in the past to play a critical role in SR-B-mediated transfer of lipids between lipoproteins and cells (Graf et al. 1999), our other aim was to define the impact of caveolin-1 expression on cholesterol efflux. In order to further define the impact of caveolin-1 on SR-BI and CD36 activities in hepatic cells, we used a constitutive expression strategy to obtain different cell lines, i.e. HepG2 cells overexpressing SR-BI or CD36 and HepG2 cells expressing caveolin-1 and overexpressing SR-BI or CD36 and quantified the cholesterol efflux activities of these cells. The results presented here show that SR-BI, CD36 and caveolin-1 all contribute positively to cholesterol efflux in human hepatic cells. Efflux studies were also conducted on hepatic cells isolated from SR-BI knockout (KO), CD36 KO and SR-BI/CD36 double-KO (dKO) mice, showing that mouse hepatic CD36 does not play a significant role in cholesterol efflux.



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Materials.*

Human plasma was obtained from the Bioreclamation (Hicksville, NY). The human hepatoma cell line HepG2 was obtained from ATCC (Rockville, MD). The plasmids pBluescript KS-, pRc/CMV and pZeoSV as well as Zeocin were purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario). Minimal essential medium (MEM), Williams' E medium, newborn calf serum, glutamine and G418 were from Life Technologies (Burlington, Ontario). Fetal Clone I was purchased from HyClone (Logan, UT) while fatty acid-free (FFA) or regular bovine serum albumin (BSA) (fraction V) were obtained from Sigma-Aldrich (Mississauga, Ontario). [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-cholesterol (40-60 Ci/mmol) was bought from Perkin Elmer Life Sciences (Woodbridge, Ontario). Antibodies and their sources were as follows: rabbit IgG anti-SR-BI, anti-SR-BII, anti-ABCA1, anti-ABCG1 and anti-CD36 were from Novus Biologicals (Littleton, CO); rabbit IgG anti-caveolin-1 (polyclonal antibody- pAb C13630) was from BD-Transduction Laboratories (Mississauga, Ontario) and mouse IgG anti-CD36 antibody FA6-152-FITC was bought from Immunotech (Westbrook, Maine).

### *Preparation of stable transformants.*

The full length human CD36 cDNA was recovered by *Eco*RI digestion of the pUC 18 vector (ATCC). The cDNA was subcloned in the eucaryotic expression vector pZeoSV (Invitrogen) and verified for sense orientation. HepG2 cells at 80% confluency were stably transfected with this vector using the standard calcium phosphate method. Zeocin-resistant cells were selected with 800 µg/ml of Zeocin for 3-4 weeks and clones were then isolated, propagated and maintained with 500 µg/ml of Zeocin. HepG2 cells overexpressing SR-BI or caveolin-1 were described elsewhere (Rhains et al. 2004, Truong et al. 2006). Also, HepG2 cells expressing caveolin-1 were stably transfected with either the vector expressing SR-BI or CD36. Zeocin- and G418-resistant cells were selected with 800 µg/ml of Zeocin and 500 µg/ml of G418. Subsequently, clones were isolated and maintained with 500 µg/ml of Zeocin and G418.

### *Animal models.*

Heterozygous B6/129S-*Srbl*<sup>tm1kri</sup> (Rigotti et al. 1997) breeding pairs were obtained from Jackson Labs (Bar Harbor, ME) in order to generate a colony. As female SR-BI KO mice are infertile (Rigotti et al. 1997, Trigatti et al. 1999B), the colony was maintained by breeding male homozygous (-/-) KO mice with heterozygous (+/-) females. CD36 KO mice (Febbraio et al. 1999) were a gift from Dr. Maria Febbraio (Cleveland, Ohio). To obtain SR-BI/CD36 dKO mice, male homozygous (-/-) SR-BI were crossbred with female homozygous (-/-) CD36. Littermates from that generation (SR-BI +/- and CD36 +/-) were then backcrossed to obtain SR-BI/CD36 dKO mice. The dKO mice show slightly higher levels of plasma cholesterol and a greater HDL-cholesterol peak than those of SR-BI KO mice (Luangrath & Brissette, personal data). SR-BI genotypes were determined by the PCR method of Rigotti et al. (1997). CD36 genotyping was done by PCR analysis using specific primers for the targeted allele (5'- CAGCTCATAATTGCTGTTTATGCATG- and 3' - CGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATC). PCR cycle conditions were 94°C for 1 minute, 65°C for 1 minute and 70°C for 2 minutes for 30 cycles with a final extension of 2 minutes at 70°C. The PCR product (~750-800 bp) was size fractionated on 1.2% agarose gels and visualized with ethidium bromide. Normal mice were generated from the normal background. All mice were housed in temperature and humidity controlled rooms with 14 h light/10 h dark cycle. The animals were provided with a standard mouse chow diet and drinking water. This study was conducted according to protocols approved by the Animal Care Use Committee of Université du Québec à Montréal. Six to eight-week-old mice were used.

### *Cell culture.*

HepG2 cells were grown in MEM supplemented with 10% fetal clone I, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) and L-glutamine (4 mM). Medium was changed every 2-3 days and cells were propagated every 7 days. Three days prior to the assay,  $4.5 \times 10^5$  cells were seeded in 3.8 cm<sup>2</sup> culture dishes (12-well dish).

### *Preparation of lipoproteins.*

To the plasma was added 0.01% (w/v) of EDTA, 0.02% (w/v) of sodium azide and 10 µM of phenyl-methyl-sulfonyl fluoride before the isolation of lipoproteins, which was achieved by

ultracentrifugation. Human HDL<sub>3</sub> (density 1.125-1.21 g/ml) were prepared as described by Brissette and Noël (1986).

*Isolation of hepatic liver cells and primary cultures of mouse hepatocytes.*

Hepatic cells were isolated from mouse liver as described by us (Truong et al. 2000, Bourret et al. 2006). Mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of 85 mg/kg pentobarbital. The portal vein was cannulated with a 23-gauge plastic cannula. First, the liver was perfused with calcium free Hank's balanced salt solution (HBSS) pH 7.4 at 37°C, pre-gassed with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, at a flow rate of 5 ml/min. Subsequently, the liver was perfused with a collagenase solution (100 U collagenase/100 ml HBSS containing 5 mM calcium) for 7 min. Hepatic cells were gently released from the Glisson capsule and isolated hepatic cells were maintained in Williams' E medium (WME) containing 10% newborn calf serum and 0.5% gentamycin. Hepatic cells were isolated with similar yields from livers of all mice, with average values of approximately 5x10<sup>7</sup> cells per liver. Cell viability was assessed by trypan blue (final concentration 0.2%) exclusion immediately after isolation, and varied between 75 and 90% of the total amount of cells isolated. Cells were plated in 12-well plastic dishes, pre-coated with collagen (3 µg/ml), at a density of 8 x 10<sup>5</sup> viable cells/well in 1 ml of culture medium. After a 3 h adherence period, non-viable cells were removed from the cultures by careful washing. The medium was then replaced by MEM. Primary cultures were used in assays after an overnight culture.

*Protein expression.*

Cell proteins were obtained by the method of Yoshimura et al. (1987). Proteins (50-150 µg) were separated by 6, 8 or 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by western blotting to nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 5% milk powder for 90 minutes or incubated overnight with 2% milk powder. Primary antibodies such as anti-SR-BI (1:4000), anti-caveolin-1 (1:5000), anti-SR-BII (1:2000), anti-ABCA1 (1:500), anti-CD36 (1:2000) [NB-145] was used for human CD36 and NB-144 for mouse as the latter reacts stronger with mouse proteins and its specificity was confirmed with a positive control: mouse cardiac CD36 (data not shown)] or anti-ABCG1 (1:2500) were diluted in buffer A (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and

incubated with the nitrocellulose membranes for 2 hours at 37°C. The membranes were washed three times for 5 minutes with buffer A. The second antibodies (goat anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase) were diluted in buffer A and incubated with membranes as described for primary antibodies. The membranes were washed three times for 5 minutes with buffer A and the bands visualized using enhanced chemiluminescence. To measure cell surface protein expression for CD36, flow cytometry analysis was used. Cells were washed twice in PBS. About  $0.5 \times 10^6$  cells were suspended in 200  $\mu$ l containing an anti-CD36 (FA6-152) conjugated with a fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) for 1 h at 4°C. At the end of the incubation, cells were washed 3 times in PBS and were resuspended in FACSFlow liquid and protein fluorescence was performed using a fluorescence-activated cell sorting (FACScan) flow cytometer (Becton Dickinson). Data were expressed as the percentage of the mean fluorescence intensity (MFI).

*Cholesterol efflux assay.*

Cells at 80% confluence were labeled with 1  $\mu$ Ci [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-cholesterol for 24 hours at 37°C and then equilibrated with 1 ml of MEM-0.2% BSA for 24 hours at 37°C. Efflux assay was performed in the absence or presence of 50  $\mu$ g/ml HDL<sub>3</sub> for 4 hours at 37°C. At the end of the incubation, the medium was harvested and the cells were solubilized in 1.5 ml of 0.1 N NaOH, assayed for protein content and counted for radioactivity in a beta-counter (Wallach-Fisher). Percentage of efflux was calculated by subtracting the radioactive counts of the absence of HDL<sub>3</sub> from the radioactive counts in the presence of HDL<sub>3</sub> and then divided by the sum of the radioactive counts in the media plus the cell fraction.

*Protein fractionation by discontinuous sucrose gradient.*

The proteins of different subtypes of HepG2 cells as well as mouse hepatic cells were fractionated by sucrose gradients as described elsewhere (Song et al. 1996A). Briefly, three 75 cm<sup>2</sup> flasks were washed twice with 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS). Cells were scraped and suspended in 2 ml of 500 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11. Cells on ice were disrupted by 20 strokes of a 5 ml tight-fitting glass Dounce homogenizer, three 10-second bursts with a Polytron homogenizer (Brinkman) and three 20-second sonication bursts at 50% maximum power (Branson Sonifier 250). The homogenate was rapidly mixed with 2 ml of 85% sucrose

in morpholinoethanesulfonic acid (MES)-buffered saline (MBS), pH 6.5 in a 12 ml ultracentrifuge tube. The top was layered with 4 ml of 35% sucrose in MBS plus 250 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and 4 ml of 5% sucrose in MBS- $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Gradients were spun at 190,000  $g$  for 18 hours at 4°C in an SW41 rotor (Beckman). Twelve 1 ml fractions were collected from the top. Rafts floated at the 5-35% sucrose interface (fractions 4-6) and were visible as a cloudy white band. Proteins of fractions 1-12 were precipitated with 21% TCA and suspended in 300  $\mu\text{l}$  0.2 N NaOH plus 1% SDS for immunoblotting. Fraction 13 (pellet) was suspended in 300  $\mu\text{l}$  MBS, pH 6.5. Aliquots of each fraction (100  $\mu\text{l}$ ) were loaded on gels. Lipid rafts (fractions 4-6) typically contained 15% of the total protein in the gradient. All fractions were analyzed by immunoblotting for SR-BI, SR-BII, CD36 and caveolin-1.

*Other methods.*

Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951) with BSA as standard. Two-tailed Student's paired t-tests were used to determine significant differences between results.

## RESULTS

As our goal was to establish the importance of hepatic SR-BI and CD36 in cell cholesterol efflux, cell localization of these proteins was assessed by fractionation on sucrose gradients. A similar investigation was conducted for SR-BII. This localization study is relevant since CD36 and SR-BII were shown in different cell types to be in large part intracellular (Ring et al. 2006, Eckhardt et al. 2004) and this might question their true implication in cell cholesterol efflux. As shown previously by us (Rhainds et al. 2004), both SR-BI monomers and dimers are mainly found in low-density fractions (fractions 4-6) representative of caveolae and lipid rafts (Figure 1A). Differently, SR-BII are above all found in high-density fractions (Figure 1B; fractions 8-11), thus they are mainly intracellular. Figure 1C reveals that CD36 is detected in low-density fractions of HepG2 cells, as 80 and 160 kDa proteins, indicating that both CD36 monomers and dimers exist in lipid rafts. In high-density fractions a 130 kDa protein is detected, which is considered as a nonspecific reaction by the manufacturer. Our other finding is that a large proportion of CD36 monomers are in intracellular fractions in HepG2 cells. Figure 1D shows that caveolin-1 is not at a detectable level in HepG2 cells. Thus, the receptors detected in low-density fractions are rather in lipid rafts than in caveolae.

To define the roles of CD36 and SR-BI, the efflux activities of normal HepG2 cells and of cells overexpressing either CD36 or SR-BI had to be quantified. Furthermore, in order to address the impact of caveolin-1 expression on both receptor activities, SR-BI and CD36 efflux activities when overexpressed in HepG2 cells or in HepG2 cells overexpressing caveolin-1 had to be compared. Stable transformants of HepG2 cells expressing either caveolin-1 (Truong et al. 2006) or SR-BI (Rhainds et al. 2004) were already available. For this study, we had to generate HepG2 cells overexpressing CD36 and other overexpressing both caveolin-1 and SR-BI as well as both caveolin-1 and CD36. For these two last subtypes, the expression vector pZeoSV containing the full sense cDNA of human SR-BI or CD36 was transfected in HepG2 cells expressing caveolin-1. Cellular clones were obtained and the expression of SR-BI and caveolin-1 were determined by western blotting. Since the majority of CD36 is intracellular in HepG2 cells, the protein level was estimated by flow cytometry in

order to evaluate only plasma membrane CD36, the fraction likely involved in cholesterol efflux. We have selected many cellular clones but only the ones that have similar overexpression levels of SR-BI or CD36 were included in this study. As shown in figure 2A, western blot analysis reveals that HepG2 cells overexpressing SR-BI (SR-BI+) and HepG2 cells overexpressing both caveolin-1 and SR-BI (Cav1/SR-BI+) express 3.1-fold ( $p < 0.005$ ) and 2.6-fold ( $p < 0.0001$ ) respectively the level of SR-BI in normal HepG2 cells. FACScan analysis (Figure 2B) reveals that HepG2 cells overexpressing CD36 (CD36+) as well as HepG2 cells overexpressing both caveolin-1 and CD36 (Cav1/CD36+) show CD36 levels 2.4-fold ( $p < 0.0001$ ) higher than normal. The figure shows that the overexpression of SR-BI or CD36 does not modulate the expression level of each other. As seen in figure 2A, caveolin-1 is only detectable in cells that were transformed with the caveolin-1 vector. ApoA-I can also promote cholesterol efflux (Sviridov et al. 1995). As HepG2 cells can synthesize and secrete apoA-I, we measured the secreted levels of apoA-I by the different cell lines and found no difference between cell lines (data not shown). As ABCA1 (Bortnick et al. 2000), SR-BII (Webb et al. 1998) and ABCG1 (Wang et al. 2004) were also linked to cholesterol efflux, we quantified the level of expression of these proteins in our different subtypes of HepG2 cells. No significant difference was observed in the abundance of ABCA1 and SR-BII (Figure 2A). In the 3 set of samples quantified for ABCG1, either no effect or a reduced expression was observed in cells co-expressing both a receptor and caveolin-1 (Cav1/SR-BI+ and Cav1/CD36+) (data not shown). The reason for this last finding is obscure, but nevertheless we can conclude that any increase in efflux detected in the different cell subtypes could not be attributable to a secondary up-regulation of other efflux mediators.

We have also investigated if any of the HepG2 subtypes show differences in their receptors cell localizations. Overall, figure 1 shows no major difference for SR-BI and SR-BII. It is also notable that caveolin-1 is predominantly restrained to low-density fractions when it is expressed in HepG2 cells (Cav1/SR-BI+ and Cav1/CD36+), indicating that we generated cells with caveolae. The effect on CD36 structure and cell localization is more drastic. In fact, overexpression of SR-BI leads to higher molecular forms of CD36 (presumably

tetramers). Similar results are observed when CD36 is overexpressed. Co-expressing either receptor with caveolin-1 has no further impact.

The different subtypes of HepG2 cells were loaded in labeled cholesterol and their cholesterol efflux to HDL were measured. Compared to control HepG2 cells, cells overexpressing SR-BI, CD36 or caveolin-1 show 106% ( $p < 0.0001$ ), 92% ( $p < 0.0001$ ) and 48% ( $p < 0.005$ ) greater efflux abilities respectively (Figure 3), indicating that both receptors are equipotent and that caveolin-1 expression has an impact on cholesterol efflux either directly by its own activity or indirectly by favoring that of CD36 and/or SR-BI at normal level(s). Co-expressing caveolin-1 with SR-BI or CD36 increases cholesterol efflux by 144% and 166% ( $p < 0.0001$ ), respectively compared to normal HepG2 cells, while overexpression of SR-BI or CD36 increases cholesterol efflux by an additional 70% and 79% ( $p < 0.05$ ), respectively compared to HepG2 cells expressing caveolin-1 alone. Adding up the contribution (48%) of caveolin-1 expression in cholesterol efflux to these values suggests that caveolin-1 works in an additive fashion rather than by modulating the ability of SR-BI and CD36. Overall, our findings suggest that in HepG2 cells, the three investigated proteins have the ability to efflux cell cholesterol.

In addition, to define the importance of mouse hepatic SR-BI and CD36 in cholesterol efflux, primary cultures of hepatic cells were prepared from normal, SR-BI KO, CD36 KO and SR-BI/CD36 dKO mice. These mouse models provided us with cells that are 100% deficient in one or both receptor(s) and gave the opportunity to define if cholesterol efflux is correlated to SR-BI or CD36 expression in normal mouse hepatic cells. Cellular cholesterol was labeled with [ $^3\text{H}$ ]-cholesterol and cells were incubated in presence of 50  $\mu\text{g/ml}$  of human HDL<sub>3</sub> as acceptors. Figure 4 shows that in the absence of SR-BI, cholesterol efflux is reduced by 41% ( $p < 0.005$ ) while the inactivation of CD36 gene reduced it by 20%. However, this last reduction is not statistically different. Finally, the complete deficiency of SR-BI and CD36 led to a loss of 56% ( $p < 0.05$ ) compared to normal hepatic cells. As this value is not significantly different from that obtained with SR-BI deficient cells, we conclude that in the mouse hepatic cell, CD36 is not playing a significant role in cell cholesterol efflux. To understand the reasons for the difference between the implication of CD36 in human and



mouse hepatic cells, mouse hepatic cell proteins were fractionated by sucrose gradient and tested for SR-BI, SR-BII, CD36, and caveolin-1. We show in figure 5 that differently from observed with HepG2 cells; 1) mouse SR-BI are not only confined to low-density fractions (fractions 4-6) but are also present in high-density fractions (fractions 8-11); 2) in high-density fractions, there is as much SR-BI dimers as monomers; 3) SR-BII are not only found in high-density fractions but are also detected in low-density fractions in mouse hepatic cells; 4) in low-density fractions, the anti-CD36 detected 75 kDa and 90 kDa proteins. To ascertain which one corresponds to murine CD36, the last well of the gel (lane 13) was loaded with a sample of mouse cardiac homogenate as this tissue is known to be CD36 rich. It is therefore concluded that the 75 kDa protein is reminiscent of CD36 while the identity of the 90 kDa protein is unknown. In high-density fractions a 50 kDa protein is detected that is likely the immature form of CD36. Another major difference from HepG2 cells is that no CD36 dimers are detectable in low-density fractions but they rather appear to be confined to high-density fractions.

## DISCUSSION

Our comparison of cellular localization of various lipoprotein receptors revealed important differences between mouse and human hepatic cells (HepG2 cells). Indeed, there are more SR-BI dimers in mouse hepatic cell than in HepG2 cells and dimers can also be found in higher-density fractions. It is noteworthy that the localization of SR-BII has been evasive in the literature. Some authors reported that SR-BII colocalized (Webb et al. 1998) and coimmunoprecipitated with caveolin-1 (Mulcahy et al. 2004) and in contradiction, other studies showed that SR-BII is mainly expressed intracellularly in nonpolarized CHO cells (Eckhardt et al. 2004, 2006). Here we show that in HepG2 cells, SR-BII is localized mainly in intracellular compartments while in mouse hepatic cells, SR-BII is also found within low-buoyant density fractions known to be representative of caveolae and lipid rafts. Thus, while it is unlikely that in HepG2 cells, SR-BII plays a significant role in cell cholesterol efflux, it is possible that in mouse hepatic cells, SR-BII contribute to the efflux. In normal HepG2 cells, CD36 is found as monomers and dimers in low-density fractions. CD36 dimers were previously observed in HeLa cells (Daviet et al. 1997), but we further show that those exist only in low-density fractions. CD36 monomers are quite abundant in high-density fractions (intracellular compartments). This phenomenon has been reported earlier in rat cardiac muscle where CD36 resides exclusively in an endosomal, insulin-insensitive vesicle population (Muller et al. 2002). Also, the study of Ring et al. (2006) has revealed that in the absence of caveolin-1, CD36 is retained in an intracellular pool in mouse embryonic fibroblasts, suggesting that the presence of caveolin-1 is important to target CD36 to the plasma membrane. Interestingly, we found that in mouse hepatic cells known, as in HepG2 cells, to express a very low level of caveolin-1 compared to fibroblasts (Truong et al. 2006), CD36 monomers are mainly found in lipid rafts. This can be explained either by a sufficient level of caveolin-1 expression in mouse hepatic cells or to differences relevant to cell types. In HepG2 cells, CD36 are found in both low- and high-density fractions. As these cells were shown by us (Truong et al. 2006) to express a lower level of caveolin-1 than mouse hepatic cells, we compared CD36 localization between normal and our CAV+ HepG2 cells. Patterns were similar (data not shown), suggesting no important role of caveolin-1 in the localization of hepatic CD36 in low-density fractions.

For this study, we have produced HepG2 cells overexpressing CD36. Having already shown that caveolin-1 expression in HepG2 cells favors SR-BI dimerization (Truong et al. 2006), we looked at the effect of caveolin-1 expression on CD36 localization and dimerization as well as at the effect of CD36 and of SR-BI overexpression on both receptors localization and dimerization. Although CD36 and SR-BI overexpression do not influence these parameters for SR-BI, both CD36 and SR-BI overexpression lead to the apparition of a higher molecular form of CD36 in low-density fractions that appears to be a tetramer. To our knowledge CD36 tetramers were never shown in the past, however SR-BI tetramers were described very recently by Sahoo et al. (2007). It can be speculated that higher than normal level of CD36 in HepG2 cells favors homo-oligomerization. Also, as we observed that an overexpression of SR-BI has the same effect, it could be hypothesized that SR-BI and CD36 can form hetero-tetramers. This phenomenon is intriguing and deserves further investigation.

The ability of SR-BI in cholesterol efflux is quite well established. However, there is so much conflicting data regarding the role of caveolin-1 in cholesterol efflux. Some studies show it has no effect (Matveev et al. 2001, Wang et al. 2003), others demonstrate it lowers the level (Frank et al. 2002), and more recently in HepG2 cells, our group (Truong et al. 2006) and Fu et al. (2004) support the notion that caveolin-1 enhances cholesterol efflux. Concerning CD36, very few studies have addressed its role in cholesterol efflux and none in hepatic cells. Also, the presence of CD36 in the liver has been tremendously questioned lately. Up to now, Maeno et al. (1994) demonstrate its presence in humans but three others reports showed that the receptor is expressed at only low levels in the liver of rats (Abumrad et al. 1993, Pelsers et al. 1999, van Nieuwenhoven et al. 1995). In addition, two studies reported that the level of expression of CD36 by hepatocytes is dependent on genetic background, i.e. higher expression in the liver of female rats compared with males (Zhang et al. 2003, Stahlberg et al. 2004). In this study, we show that CD36 is expressed in HepG2 cells and for the first time in mice liver. Also, our study reveals that the overexpression of CD36 in HepG2 cells increases cell cholesterol efflux (Figure 3), suggesting that also human hepatic CD36 plays a significant role in cell cholesterol efflux. Thus, in HepG2 cells, all three proteins (SR-BI, CD36 and caveolin-1) contribute to cell cholesterol efflux but SR-BI is the

most efficient one. This is in agreement with Parathath et al. (2004) who have shown that Sf9 cells expressing CD36 are less efficient to enhance cholesterol efflux than cells expressing SR-BI. On the other hand, our study with primary cultures of mouse hepatic cells completely deficient in SR-BI, CD36 or in both showed the importance of only SR-BI in cholesterol efflux to HDL<sub>3</sub>. Quite a few reasons can explain this divergence. For instance, it can be explained by a difference between human and mouse CD36 sequences. It is also possible that mouse CD36 is at a too low concentration in normal mouse hepatic cells to play a significant role. Also, as differently for HepG2 cells no multimeric forms of CD36 were detected in the low-density fractions of mouse hepatic cells, one can speculate that CD36 is not participating to cholesterol efflux as a monomer, assuming that the dimeric form detected in the intracellular fractions plays no significant role.

In conclusion, our results demonstrate that only SR-BI in mouse hepatic cells is important in cellular cholesterol efflux while both SR-B (SR-BI and CD36) can modulate positively cholesterol efflux in HepG2 cells. In addition, we show that caveolin-1 can also participate to efflux. Thus, any intervention to increase one of these proteins may favor HDL synthesis through hepatic lipidation of newly secreted apoA-I and therefore RCT.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank very sincerely Dr. Maria Febbraio for her kind donation of CD36 KO mice, Frédéric Letarte for generating HepG2 cells overexpressing CD36 and Mr. Denis Flipo for his assistance with flow cytometry analysis. We also thank Jennifer Slaughter for careful reading of the manuscript. This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR) (grant MOP-5309) attributed to L.B. T.Q.T. was the recipient of scholarships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the "Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide à la recherche" (FCAR).

## Figure Legends

Figure 1: Immunoblotting of HepG2 cells, SR-BI(+), CD36(+), Cav1/SR-BI+ and Cav1/CD36+ proteins fractionated by discontinuous sucrose gradient. Cell proteins were fractionated with detergent-free sodium carbonate discontinuous 5–40% sucrose gradients as described under Materials and methods. The twelve gradient fractions were concentrated with TCA and 50  $\mu$ l sample of each fraction and fraction 13 (pellet) were loaded on 8% reducing SDS-PAGE. After transfer on nitrocellulose, proteins were blotted and immunodetected by enhanced chemiluminescence for SR-BI (Panel A), SR-BII (Panel B), CD36 (Panel C) and caveolin-1 (Panel D). The images are representative of three independent experiments.

Figure 2: Expression levels of SR-BI, SR-BII, CD36, caveolin-1 and ABCA1 in different subtypes of HepG2 cells. A) Cells were obtained as described in Materials and methods and 50-150  $\mu$ g of protein were analyzed by 6-10% SDS-PAGE and immunoblotted with appropriate antibody for SR-BI, SR-BII, caveolin-1 and ABCA1. The images are representative of two to four independent experiments. B) Cells were labelled with an anti-CD36 coupled with a FITC and the fluorescence was analyzed with flow cytometry as described in Materials and methods. The images are representative of three independent experiments.

Figure 3: Efflux of [ $^3$ H]-cholesterol to HDL<sub>3</sub> in different subtypes of HepG2 cells. Efflux assay was performed in the absence or presence of 50  $\mu$ g/ml HDL<sub>3</sub> for 4 hours at 37<sup>o</sup>C as described under Materials and methods. Each result represents the mean percentage  $\pm$  SEM of 6 experiments each conducted in triplicate.

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.005$ ) from the results obtained with control cells.

<sup>b</sup> Significantly different ( $p < 0.0001$ ) from the results obtained with control cells.

<sup>c</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the results obtained with HepG2 cells expressing SR-BI.

<sup>d</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the results obtained with HepG2 cells expressing CD36.

<sup>e</sup> Significantly different ( $p < 0.005$ ) from the results obtained with HepG2 cells expressing caveolin-1.

<sup>f</sup> Significantly different ( $p < 0.0001$ ) from the results obtained with HepG2 cells expressing caveolin-1.

Figure 4: Efflux of [<sup>3</sup>H]-cholesterol to HDL<sub>3</sub> in mouse hepatic cells. Efflux assay was performed in the absence or presence of 50 µg/ml HDL<sub>3</sub> for 4 hours at 37<sup>0</sup>C as described under Materials and methods. Each result represents the mean percentage ± SEM of 4-7 experiments each conducted in triplicate.

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the results obtained with control cells.

<sup>b</sup> Significantly different ( $p < 0.005$ ) from the results obtained with control cells.

Figure 5: Immunoblotting of normal mouse hepatic cell protein fractionated by discontinuous sucrose gradient. Cell proteins were fractionated with detergent-free sodium carbonate discontinuous 5–40% sucrose gradients as described under Materials and methods. The twelve gradient fractions were concentrated with TCA and 50 µl sample of each fraction and fraction 13 (pellet) were loaded on 8% reducing SDS-PAGE. After transfer on nitrocellulose, proteins were blotted and immunodetected by enhanced chemiluminescence for SR-BI, SR-BII, CD36 and caveolin-1. The images are representative of three independent experiments.

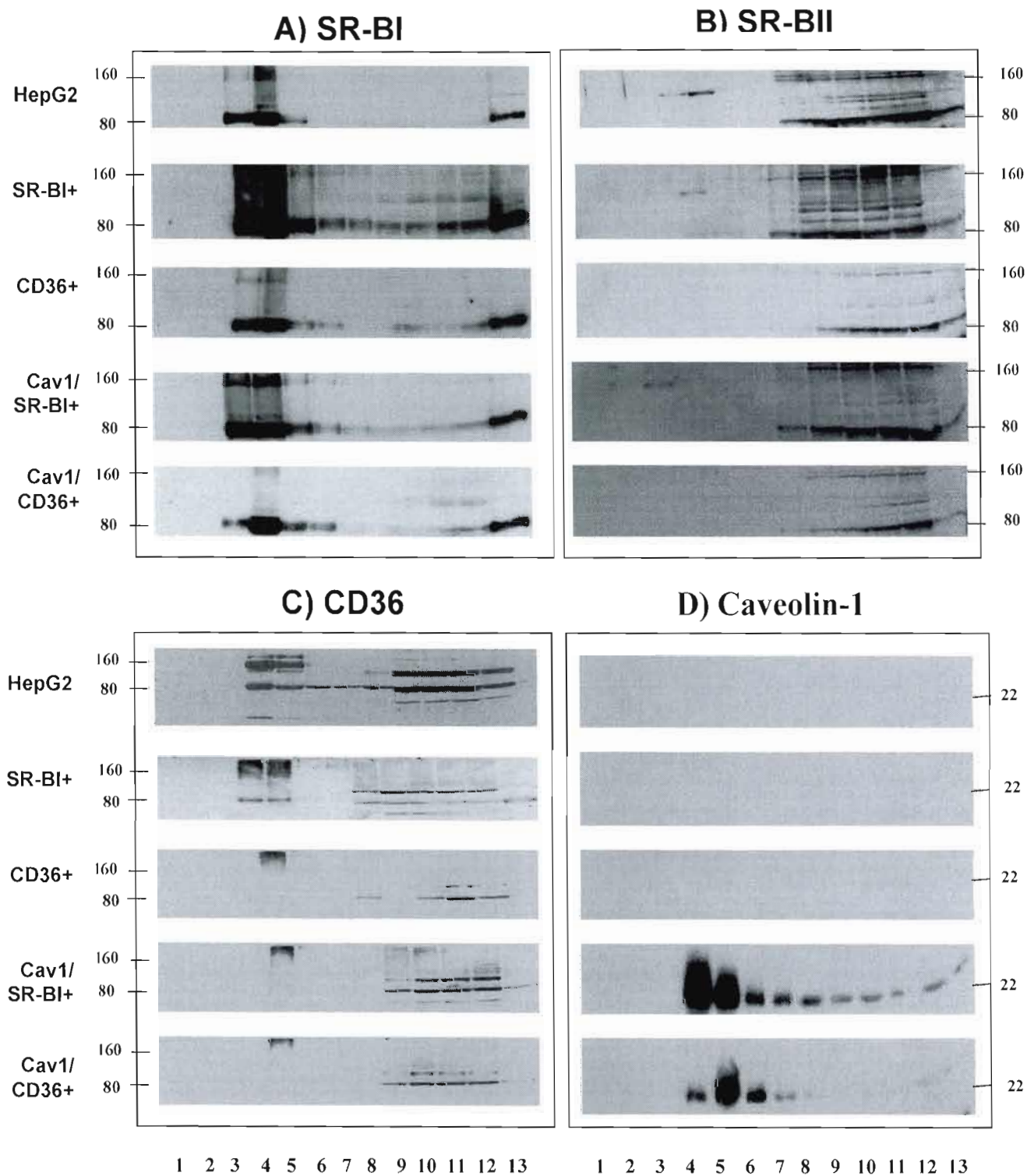
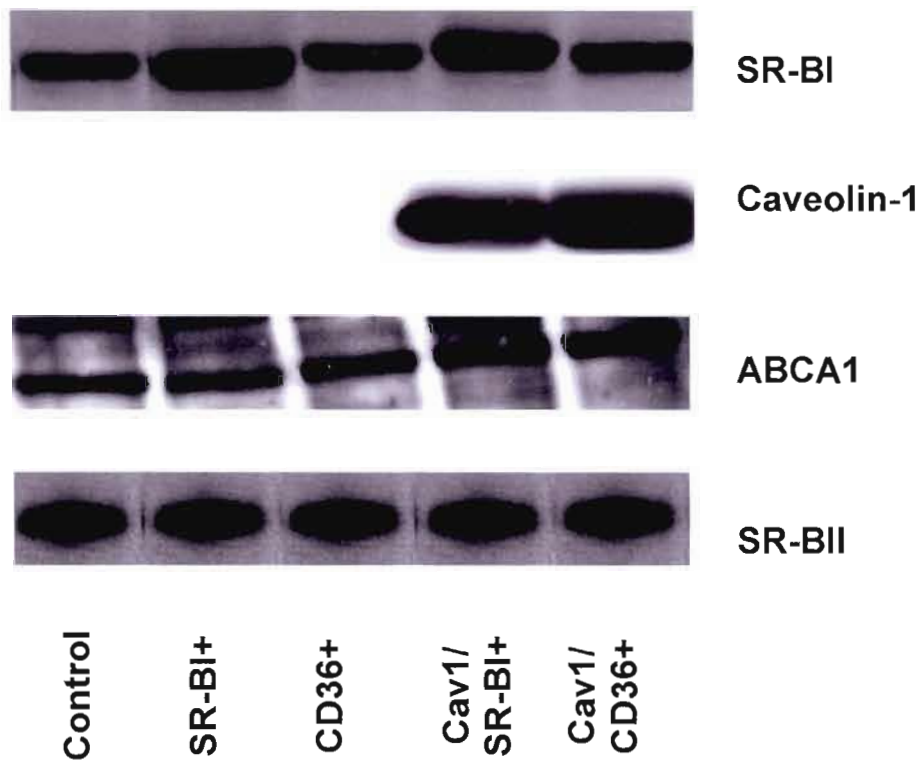


Figure 1



A)



B)

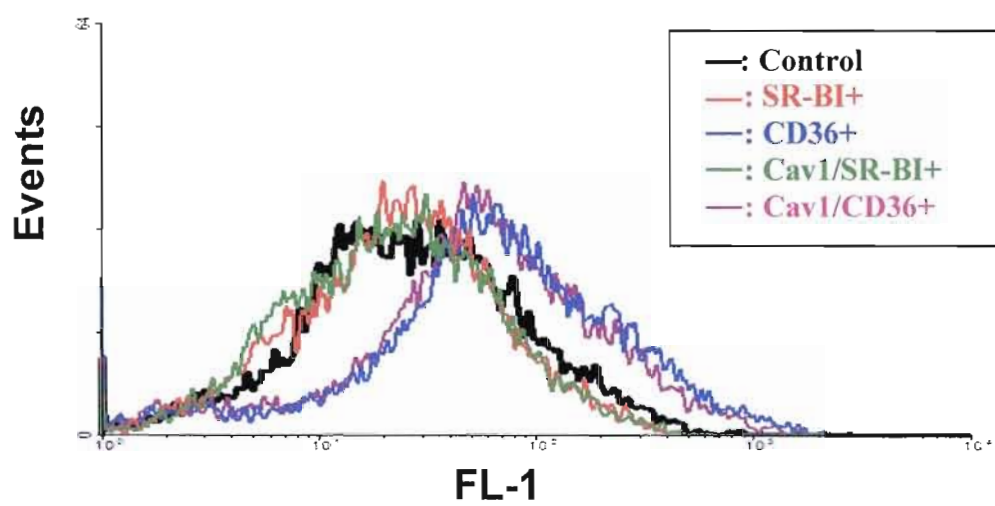


Figure 2

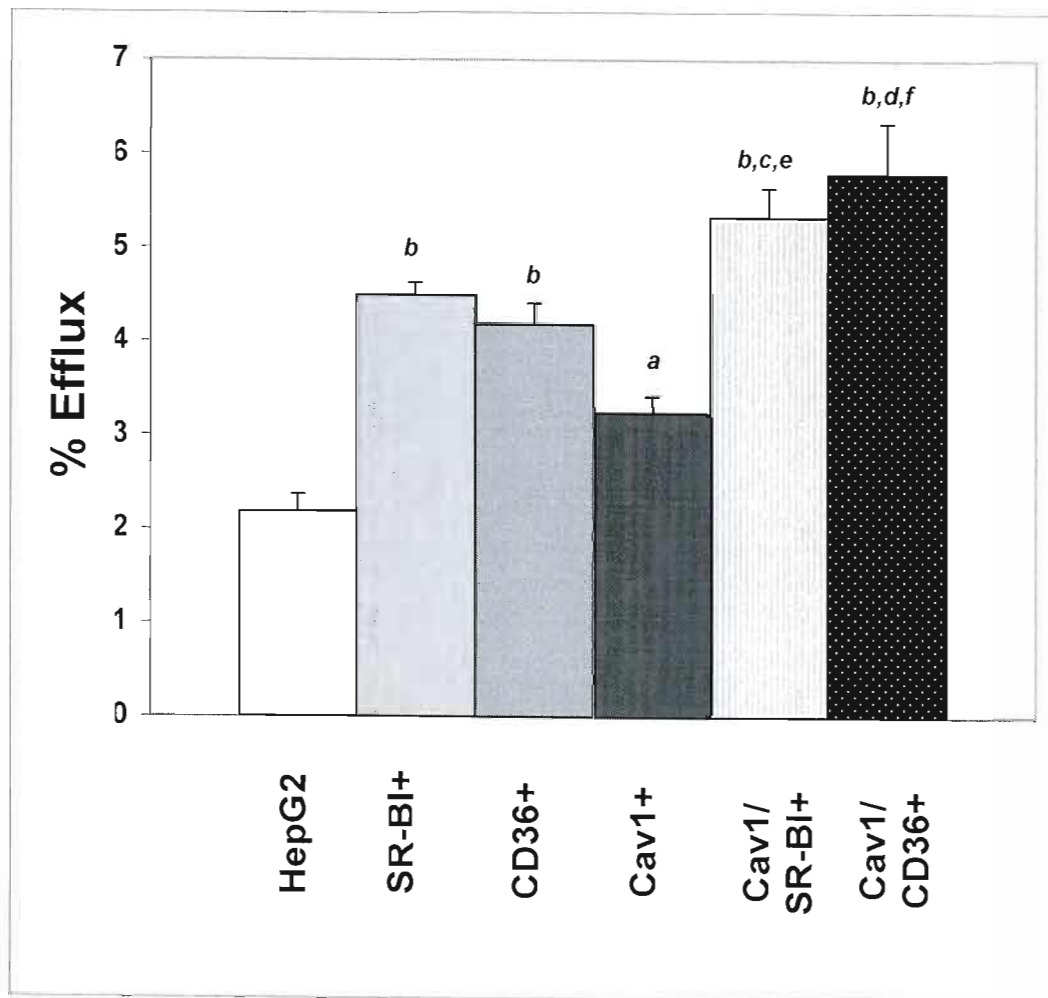


Figure 3

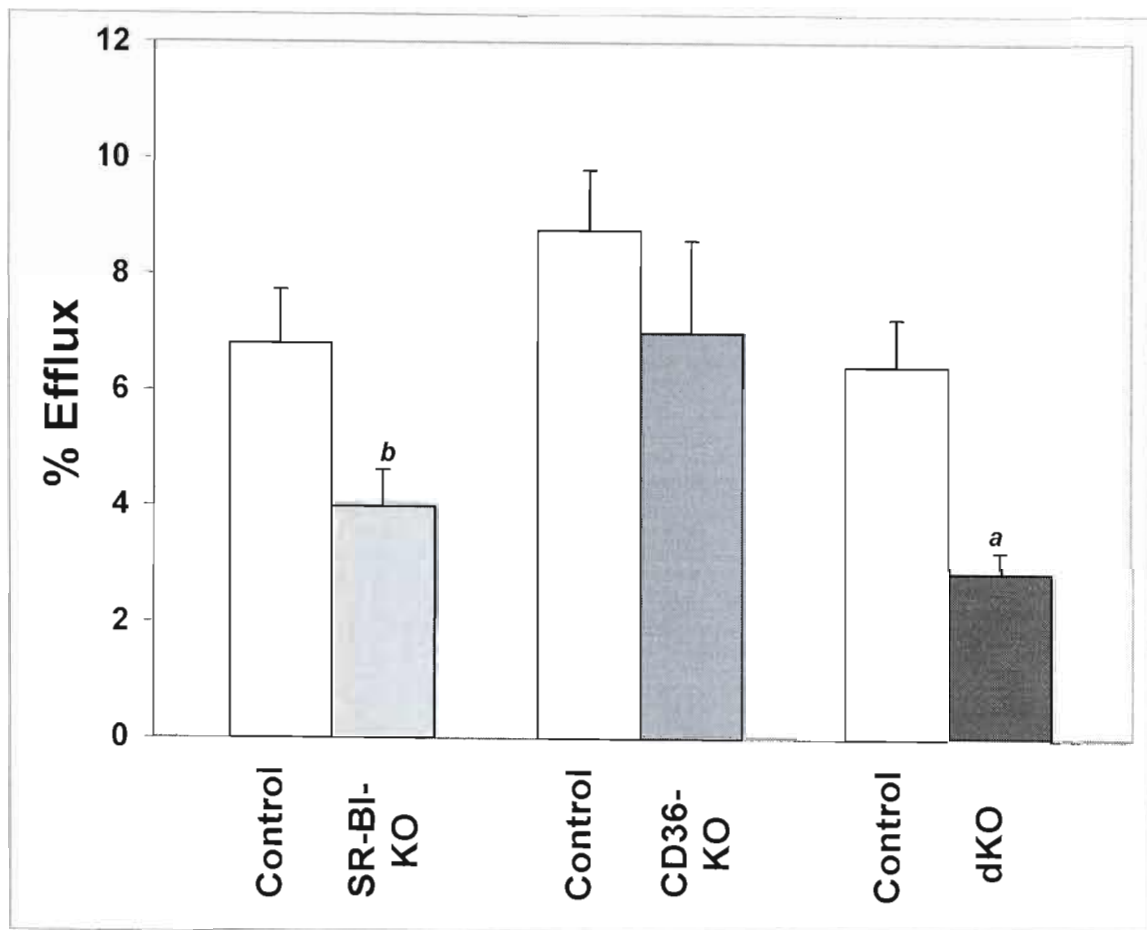


Figure 4

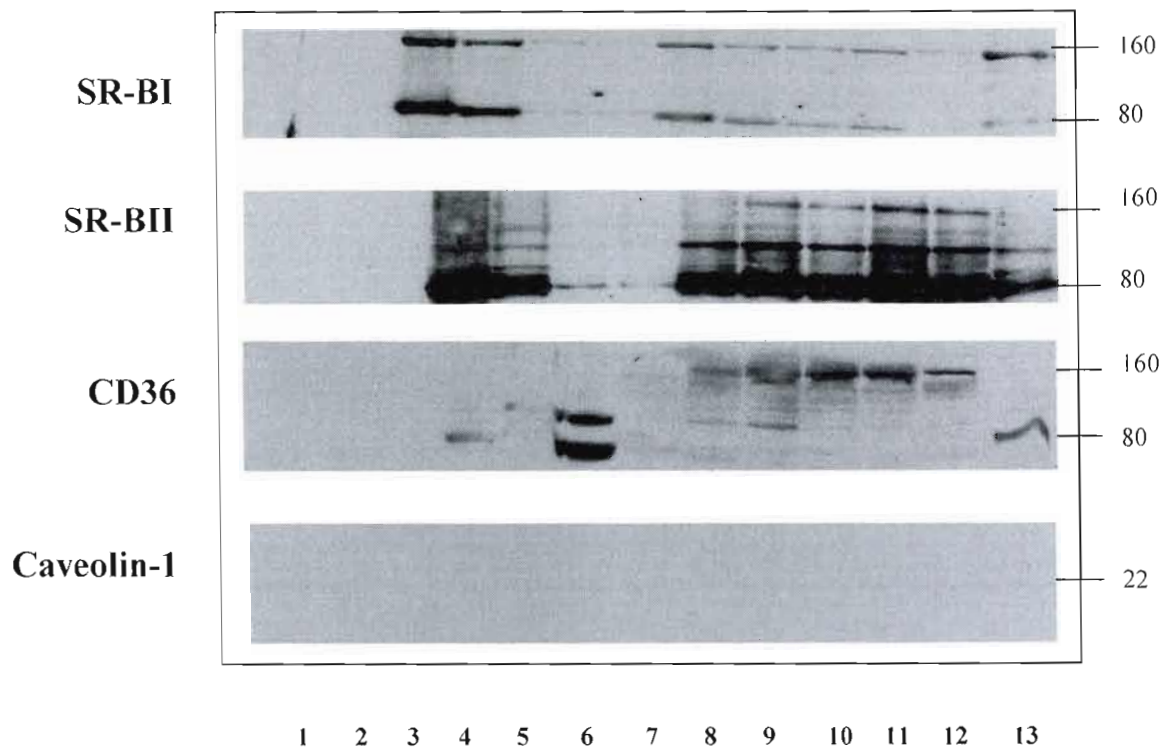


Figure 5

CHAPITRE 5:

Importance of caveolin-1 in the Metabolism of Oxidized LDL in HepG2 cells.

En préparation

Importance of Caveolin-1 in the Metabolism  
of Oxidized LDL in HepG2 cells†

To Quyen Truong\*, Dominique Aubin,  
Louise Falstrault and Louise Brissette\*

Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal,  
Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

\* To whom correspondence should be addressed:

To Quyen Truong or Louise Brissette

Département des Sciences Biologiques

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succursale Centre-ville

Montréal, Québec

Canada H3C 3P8

Tel: (514) 987-3000 ext. 4368 or 6592; Fax: (514) 987-4647

E-mail: [truong.to\\_quyen@courrier.uqam.ca](mailto:truong.to_quyen@courrier.uqam.ca) (TQ Truong), [brissette.louise@uqam.ca](mailto:brissette.louise@uqam.ca) (L. Brissette)

†This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR) (grant MOP-5309) attributed to L.Brissette. T.Q.T. was the recipient of scholarships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the “Fonds pour la formation des chercheurs et l’aide à la recherche” (FCAR).

Running title: Caveolin-1 and oxLDL

## Summary

The liver is the major organ involved in the elimination of oxidized LDL (oxLDL) which is a result of LDL deposits, an accumulation in vascular tissues, a series of chemical modification of LDL and a loss of interaction with the LDL receptor (LDLr). Receptors of the scavenger class B family, i.e. the scavenger receptor class B type I (SR-BI) and the cluster of differentiation 36 (CD36), were reported to bind oxLDL. Studies have demonstrated that these receptors can be localized or not in caveolae, a cell surface microdomain rich in free cholesterol and glycosphingolipids, which are characterized by the presence of caveolin-1. Although HepG2 cells express very low levels of caveolin-1, they express highly these SR-Bs receptors. Therefore, the aim of this study was to define the contribution of caveolin-1 in the metabolism of oxLDL in HepG2 cells. Our results demonstrate that the expression of caveolin-1 increases the binding and degradation of both mildly and standardly oxLDL. Also, our data show that caveolin-1 expression plays a role in mildly oxLDL metabolism by reducing by 50% their CE-selective uptake but has no effect on standardly oxLDL selective uptake. Our results demonstrate an increase by 27% and a decrease by 22% in mildly and standardly oxLDL-mediated cholesterol efflux respectively. Finally, we show that the expression of caveolin-1 stabilizes SR-BI and the LDLr when HepG2 cells were exposed to mildly and standardly oxLDL.

## Introduction

Clinical and epidemiologic studies have shown that an elevated level of LDL is associated with an increase risk factor for coronary heart diseases (Kannel et al. 1979). Most cells take up native LDL by the classical LDL receptor (LDLr) described by Brown and Goldstein (1986) but LDL deposits, which accumulate in vascular tissues, result in a series of chemical modification of LDL and lead to a loss of interaction with the LDLr. Indeed, LDL modification such as oxidation involves changes to both protein and non protein moieties of the LDL particle (Steinberg 1997B). Oxidized LDL (oxLDL) bind to a diverse range of transmembrane proteins, collectively called scavenger receptors, which class B scavenger receptors are members. This class contains the scavenger receptor class B type I (SR-BI) and the cluster of differentiation 36 (CD36). However, despite the high degree of homology between CD36 and SR-BI, these 2 receptors appear to play quite distinct roles in lipid metabolism and atherosclerosis. The impact of SR-BI and CD36 on atherosclerosis has been evaluated in several mouse models, and SR-BI is considered for the most part to play an antiatherosclerotic role (Arai et al. 1999) while CD36 appears to be proatherosclerotic (Febbraio et al. 2000). SR-BI and CD36 are expressed in steroidogenic organs and the liver in both rodents and humans (Acton et al. 1996, Landschultz et al. 1996, Cao et al. 1997) and in HepG2 cells (Calvo & Vega 1993, Maeno et al. 1994). Both receptors can bind oxLDL as well as native HDL, LDL and VLDL (Acton et al. 1994, Acton et al. 1996). CD36 is well recognized as a receptor for OxLDL, i.e. a high affinity to bind oxLDL followed by internalization and degradation (Endeman et al. 1993). It is well known that SR-BI mediates the selective uptake of CE from native HDL and LDL (Acton et al. 1996, Stangl et al. 1998, Rhainds et al. 2003). Also, our group reported an evidence for a CE-selective uptake pathway for standardly oxLDL in the human hepatoma cell line HepG2 (Rhainds et al. 1999) and has shown the implication of SR-BI in nonparenchymal mouse liver cells but not in parenchymal liver cells (hepatocytes) (Bourret et al. 2006). HDL were also shown to efflux cell cholesterol through SR-BI (Ji et al. 1997) and CD36 (Truong & Brissette, personal data).

At first, both receptors were shown to be localized in caveolae in cultures of extrahepatic cells (Babitt et al. 1997, Lisanti et al. 1994) but recently, these reports have been contradicted



by others who have shown that they reside in another compartment and not associated with caveolin-1 (Peng et al. 2004, Zeng et al. 2003, Truong et al. 2006). Caveolae were initially identified as 50-100 nm flask-shaped invaginations in the plasma membrane (Palade 1953). These microdomains are enriched in cholesterol and glycosphingolipids (Brown & Rose 1992) and characterized by their resistance to detergent extraction at 4<sup>0</sup>C (Kurzchalia et al. 1992) and their light density on sucrose gradients (Smart et al. 1995). In non-muscle cells, caveolin-1 is the major protein of the caveolae component. It is a 22-kDa integral membrane protein which forms a hairpin-loop structure in the lipid bilayer and binds specifically to cholesterol (Murata et al. 1995) and facilitates transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane (Smart et al. 1996).

Since hepatic cells as well as HepG2 cells express a low level of caveolin-1 (Fu et al. 2004, Truong et al. 2006) and are recognized as being the major site for oxLDL uptake, our aim was to define the potential contribution of caveolin-1 in the metabolism of oxLDL. Our results demonstrate that the expression of caveolin-1 in HepG2 cells increases the binding and degradation of both mildly and standardly oxLDL. Also, our data show that caveolin-1 expression plays a role in mildly oxLDL metabolism by reducing their CE-selective uptake but has no effect on standardly oxLDL. Our results demonstrate an increase by 27% and a decrease by 22% in mildly and standardly oxLDL-mediated cholesterol efflux respectively. In addition, our results indicate that the expression of caveolin-1 stabilizes SR-BI when exposed to all three subtypes of LDL and also the LDLr when treated with mildly and standardly oxLDL. However, the exposure of all three LDL subtypes and the expression of caveolin-1 has a minimal impact on the expression of CD36. Overall, our results suggest that the expression of caveolin-1 in HepG2 cells is beneficial because it modulates CD36 to favor the binding and degradation of oxLDL and also stabilizes SR-BI and LDLr when cells are treated with oxLDL.

## Materials and Methods

*Materials.* Human plasma was obtained from the Bioreclamation (Hicksville, NY). The human hepatoma cell line HepG2 was obtained from ATCC (Rockville, MD). Minimal essential medium (MEM), Williams' E medium, Newborn calf serum, glutamine and G418 were from Life Technologies (Burlington, Ontario). Fetal Clone I was purchased from HyClone (Logan, UT) while fatty acid-free (FFA) or regular bovine serum albumin (BSA) (fraction V) were obtained from Sigma-Aldrich (Mississauga, Ontario). [<sup>125</sup>I] (as sodium iodide, 100 mCi/ml), [<sup>3</sup>H]-cholesteryl oleate (30-60 Ci/mmol) and [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-cholesterol (40-60 Ci/mmol) were bought from ICN Biomedical (Montréal, Québec), Amersham (Oakville, Ontario) and Perkin Elmer Life Sciences (Woodbridge, Ontario), respectively. Antibodies and their sources were as follows: rabbit IgG anti-SR-BI and anti-CD36 were from Novus Biologicals (Littleton, CO); rabbit IgG anti-caveolin-1 (polyclonal antibody-pAb C13630) was from BD-Transduction Laboratories (Mississauga, Ontario) and rabbit IgG anti-LDLr from Research Diagnostics, Inc. (Flanders, NJ).

*Cell Culture.* HepG2 cells were grown in MEM supplemented with 10% fetal clone I, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) and L-glutamine (4 mM). Medium was changed every 2-3 days and cells were propagated every 7 days. Three days prior to the assay,  $4.5 \times 10^5$  cells were seeded in 3.8 cm<sup>2</sup> culture dishes (12-well dish).

*Preparation and Radiolabeling of Lipoproteins.* To the plasma was added 0.01% (w/v) of EDTA, 0.02% (w/v) of sodium azide and 10 µM of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) before the isolation of lipoproteins, which was achieved by ultracentrifugation. Human LDL (density 1.025-1.063 g/ml) were prepared as described by Brisette and Noël (1986). LDL were iodinated by a modification (Langer et al. 1972) of the iodine monochloride method of McFarlane (1948). One millicurie of sodium 125-iodide was used to iodinate 2.5 mg of LDL in the presence of 40 nmol of iodine monochloride in 0.5 M glycine-NaOH, pH 10. Free iodine was removed by gel filtration on Sephadex G-25 followed by an overnight dialysis in Tris-buffered saline (TBS). The specific radioactivity ranged from 100,000-400,000 cpm/µg of protein. LDL were radiolabeled in their CE with [<sup>3</sup>H]-cholesteryl oleate as described by

Roberts et al. (1985). Thereafter, the labeled LDL were reisolated by ultracentrifugation. The specific activity of lipoproteins labeled in CE ranged from 7,500-14,000 cpm/ $\mu$ g of protein.

*Lipoprotein Modification.* LDL preparations were dialyzed against TBS before oxidation to remove EDTA. Standardly oxLDL were prepared as in Lougheed and Steinbrecher (1996). LDL (200  $\mu$ g protein/ml TBS) were incubated with 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> for 20 h at 37°C. Oxidation was stopped by the addition of EDTA to a 100  $\mu$ M concentration and butylated hydroxytoluene to 40  $\mu$ M and oxLDL were concentrated to 2–4 mg/ml using Centriplus-100 ultrafiltration devices (Amicon, Oakville, Ont.). Standardly oxLDL typically resulted in a 2.8-fold increase in the electrophoretic mobility relative to native LDL on 0.5% agarose/barbital gels colored with Fat Red 7B. Mildly oxLDL were obtained by incubation under similar conditions but for 4 h and show a 1.5-fold increase in the electrophoretic mobility relative to native LDL.

*Binding Assay.* The cells were washed twice with 1 ml of PBS. Cells were incubated for 2 hours at 4<sup>0</sup>C with 50  $\mu$ g of protein/ml of <sup>125</sup>I-mildly-oxLDL or <sup>125</sup>I-standardly-oxLDL in a total volume of 250  $\mu$ l containing 125  $\mu$ l of MEM [2 $\times$ ] plus 4% BSA and 25 mM HEPES, pH 7.4 (total binding). Non-specific binding was determined by the addition of 2 mg of protein/ml of the appropriate non-labeled lipoprotein. The cells were solubilized in 1.5 ml of 0.1 N NaOH, assayed for protein content and counted for radioactivity in a Cobra II counter (Canberra-Packard). The specific binding was calculated by subtracting the non-specific binding of <sup>125</sup>I-labeled lipoprotein from the total binding.

*Cell Association and Degradation Assays.* Cell association of <sup>125</sup>I-lipoprotein and <sup>3</sup>H-CE-lipoprotein (20  $\mu$ g of protein/ml) was conducted for 4 hours at 37<sup>0</sup>C, as for the binding assay but without HEPES. Associated protein was quantified with a Cobra II counter (Canberra-Packard) and associated CE was counted with a beta-counter (Wallach-Fisher). Associations of <sup>125</sup>I-lipoprotein and <sup>3</sup>H-CE-lipoprotein are expressed in  $\mu$ g of protein per mg of cellular protein. Selective uptake is calculated by subtracting the protein association from the CE association. Degradation of <sup>125</sup>I-lipoprotein (20  $\mu$ g of protein/ml) was conducted for 5 hours at 37<sup>0</sup>C, as described in cell association assay. At the end of the incubation, the medium was

recovered and precipitated with trichloroacetic acid (TCA) at a final concentration of 12%. Degradation was estimated in the TCA-soluble fraction, as described by Truong et al. (2000). Cells were also solubilized in 1.5 ml of 0.1 N NaOH and assayed for protein content to normalize for cell protein.

*Cholesterol Efflux Assay.* Cells at 80% confluent were labeled with 1  $\mu\text{Ci}$  [1,2- $^3\text{H}(\text{N})$ ]-cholesterol for 24 hours at 37 $^{\circ}\text{C}$  and then equilibrated with 1 ml of MEM-0.2% BSA for 24 hours at 37 $^{\circ}\text{C}$ . Efflux assay was performed in the absence or presence of 100  $\mu\text{g/ml}$  LDL, mildly oxLDL or standardly oxLDL, for 4 hours at 37 $^{\circ}\text{C}$ . At the end of the incubation, the medium was harvested and the cells were solubilized in 1.5 ml of 0.1 N NaOH, assayed for protein content and counted for radioactivity in beta-counter (Wallach-Fisher). Percentage of efflux was calculated by subtracting the radioactive counts of the absence of lipoprotein from the radioactive counts in the presence of respective lipoprotein and then divided by the sum of the radioactive counts in the media plus the cell fraction.

*Exposure of Native LDL, Mildly oxLDL and Standardly oxLDL.* Cells were grown to 85% confluence and then treated with native LDL, mildly oxLDL or standardly oxLDL (0-1000  $\mu\text{g/ml}$  protein) for 24 h. After treatment, cells were washed twice with cold PBS and then scraped and lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail). Lysate was microcentrifugated for 25 min at 4 $^{\circ}\text{C}$  and supernatant was assessed for cell proteins. Proteins (50-100  $\mu\text{g}$ ) were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by western blotting to nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 5% dry milk for 90 minutes. Primary antibodies such as anti-SR-BI (1:5000), anti-LDLr (1:500), anti-CD36 (1:1000) or anti-caveolin-1 (1:5000) were diluted in buffer A (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated with the nitrocellulose membranes for 2 hours at 37 $^{\circ}\text{C}$ . The membranes were washed three times for 5 minutes with buffer A. The second antibody (goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase) was diluted in buffer A and incubated with membranes as described for primary antibodies. The membranes were washed three times for 5 minutes with buffer A and the bands visualized using enhanced chemiluminescence.

*Other Methods.* Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951) with BSA as standard. Two-tailed Student's paired t-tests were used to determine significant differences between results.

## Results

Our primary goal was to determine the metabolism of oxLDL in HepG2 cells expressing or not caveolin-1. Stable transformants of HepG2 cells expressing caveolin-1 (Cav13 cells) were described previously (Truong et al. 2006). Therefore, our first goal was to define if the expression of caveolin-1 in HepG2 cells would affect the ability of HepG2 cells to bind mildly and standardly oxLDL (figure 1). The specific binding of  $^{125}\text{I}$ -mildly-oxLDL and  $^{125}\text{I}$ -standardly-oxLDL were increased by 150% ( $p<0.0001$ ) and 69% ( $p<0.05$ ) respectively in Cav13 cells when compared to HepG2 cells transfected with the vector pRc/CMV without insert (control cells). Furthermore, our data indicate that the specific degradation of 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of  $^{125}\text{I}$ -mildly-oxLDL and  $^{125}\text{I}$ -standardly-oxLDL in Cav13 cells were increased by 120% ( $p<0.05$ ) and 149% ( $p<0.005$ ) when compared to control cells (figure 1). In Cav13 cells, degradation is 2-fold more ( $p<0.005$ ) from mildly than standardly oxLDL. Thus, caveolin-1 expression in HepG2 cells increases the binding and degradation from both mildly and standardly oxLDL.

We also conducted association assays with mildly and standardly oxLDL on control and Cav13 cells. Fig. 2 shows that control cells take up 3.5-fold more CE and 2.7-fold more protein ( $p<0.0001$ ) from standardly than from mildly oxLDL. Also, in HepG2 cells expressing caveolin-1, our results demonstrate that they take up 2.5-fold more CE ( $p<0.005$ ) from standardly than from mildly oxLDL. The analysis of the CE-selective uptake data (CE association minus protein association) reveals that in control cells and cav13 cells, both mildly and standardly oxLDL are subjected to this pathway. Also, CE-selective uptake is 5.1-fold ( $p<0.005$ ) and 11.8-fold more ( $p<0.0001$ ) from standardly than from mildly oxLDL, in control and Cav13 cells respectively. Additionally, we show that cell associations of  $^3\text{H}$ -CE-mildly-oxLDL and  $^{125}\text{I}$ -mildly-oxLDL were increased by 38% ( $p<0.005$ ) and 98% ( $p<0.0001$ ), respectively in Cav13 cells when compared to control cells. Mildly-oxLDL-CE-selective uptake was decreased by 50% ( $p<0.05$ ) in Cav13 cells. On the other hand, no significant difference was found between protein association, CE association or selective uptake for standardly oxLDL in Cav13 cells when compared to control cells, indicating that caveolin-1 has no impact on standardly oxLDL-CE selective uptake.

The majority of studies showed that caveolin-1 can generate cholesterol efflux when HDL is used as an acceptor (Fu et al. 2004, Truong et al. 2006, Frank et al. 2006). However, few studies were conducted to define the abilities of LDL (Fielding & Fielding 1995C) and OxLDL (Tang et al. 2004) to cholesterol efflux. Thus, cells were loaded with [<sup>3</sup>H]-cholesterol and their abilities to efflux cholesterol to LDL, mildly oxLDL or standardly oxLDL were evaluated. Figure 3 indicates that caveolin-1 expression in HepG2 cells did not change the extent of efflux when LDL was used as an acceptor while it enhances efflux by 27% ( $p < 0.05$ ) and reduces that of 22% ( $p < 0.05$ ) when mildly and standardly oxLDL were used as an acceptor, respectively in Cav13 cells when compared to control cells. Overall, expressing caveolin-1 in HepG2 cells has a greater effect in binding, degradation than in CE-selective uptake or cholesterol efflux.

It has been demonstrated that expression of CD36 (Han et al. 1997, Yoshida et al. 1998, Nakata et al. 1999) and SR-BI (Han et al. 2001) are increased in macrophages exposed to oxidized LDL. However, no studies addressed the effect on oxLDL on the expression of these receptors in hepatic cells expressing or not caveolin-1. Thus, we investigated the effects on SR-BI, CD36, LDLr and caveolin-1 expressions in both control and Cav13 cells by treating them with native LDL, mildly oxLDL or standardly oxLDL (0 to 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 h (Figure 4). In control cells, we observed a decrease in SR-BI when treated with mildly oxLDL, standardly oxLDL and particularly with LDL. In those same cells, we also showed a diminution of the LDLr when cells were treated with all three LDL subtypes but mostly with mildly and standardly oxLDL. In cav13 cells, our results indicate that caveolin-1 provides against a reduction of SR-BI when treated with all three subtypes of LDL and also of the LDLr when treated with mildly and standardly oxLDL but does not prevent it from LDL. Furthermore, the exposure of all three LDL subtypes and the expression of caveolin-1 have minimal impact on the expression of CD36. Finally, the expression of caveolin-1 has a tendency to increase that protein when treated with mildly and standardly oxLDL but not with LDL.

## Discussion

The metabolism of oxLDL is well documented on macrophages because of its relationship with foam cell formation and atherosclerosis. It was first demonstrated that scavenger receptors of class A (SR-AI and SR-AII) can bind oxLDL (Freeman et al. 1991) and later by Acton et al. (1994) that the class B receptors (SR-BI and CD36) also have the same ability. The identity of the hepatic receptor involved in oxLDL uptake and degradation is still obscure but it is known that the liver is the major organ responsible for the uptake of modified LDL from blood circulation (Nagelkerke et al. 1983, van Berkel et al. 1991). In 1999, our group has demonstrated a CE-selective uptake pathway for standardly oxLDL with HepG2 cells (Rhains et al. 1999) and recently shown the importance of SR-BI for this pathway in nonparenchymal mouse liver cells (Bourret et al. 2006). In this study, our primary goal was to evaluate the role of caveolin-1 in hepatic cells, a protein which has been colocalized with the scavenger B receptors (SR-BI and CD36) in non-hepatic cells, and its role in oxLDL metabolism.

This study is the first demonstration that the expression of caveolin-1 increases the binding and degradation of both mildly and standardly oxLDL. These hepatic cells expressing caveolin-1 do not show changes in their levels of expression of LDLr, SR-BI and CD36 but a predominant colocalization between CD36 and caveolin-1 was detected (Truong et al. 2006). As caveolin-1 is likely not a receptor of oxLDL, we suggest that the better efficiency in oxLDL degradation is due to a modulation of CD36 activity by caveolin-1, or the presence of CD36 in caveolae instead of lipid rafts. Our results also indicate that caveolin-1 expression has only an impact on CE-selective uptake from mildly oxLDL. Indeed, a 50% reduction in selective uptake is observed similarly as for LDL (Truong et al. 2006). Although, SR-BI was shown to be implicated in LDL-CE selective uptake (Brodeur et al. 2005, Rhains et al. 2003), our group recently reported that hepatocyte SR-BI is not involved in mildly and standardly oxLDL-CE selective uptake (Bourret et al. 2006). Thus, as the HepG2 cell's origin is parenchymal, it is unlikely that SR-BI is involved. On the other hand, CD36 was shown to mediate HDL-CE selective uptake although at a lower rate compared with SR-BI (Gu et al. 1998, Connelly et al. 1999) and its ability to selectively take up oxLDL-CE is still unknown.



Altogether, we suggest that the expression of caveolin-1 in HepG2 cells modulates CD36 activity to reduce the CE selective uptake from mildly oxLDL.

Up to date, there is no classical work done on cholesterol efflux towards LDL and oxLDL in hepatic cells and also in association with caveolin-1 expression. Fielding and Fielding (1995C) have reported that when  $^3\text{H}$ -labeled free cholesterol was selectively transferred to the cells from labeled LDL, cell free cholesterol is increased by a modest 15% in fibroblasts which contain very high levels of caveolin-1 (Scherer et al. 1994). Our results show that cholesterol efflux by LDL is unchanged. The reason for this discrepancy with our data could be explained by a lower level of expression of caveolin-1 in HepG2 cell transformants compared to human fibroblasts as demonstrated by us previously (Truong et al. 2006). Tang et al. (2004) have reported that exposure to oxLDL elevated ABCA1 in both protein and mRNA levels and increased apoA-I-mediated cholesterol efflux in a time- and dose-dependent manner. In this study, we show for the first time that the expression of caveolin-1 increased mildly oxLDL-mediated cholesterol efflux while it decreased standardly oxLDL-mediated cholesterol efflux.

Our work demonstrates that in HepG2 cells, SR-BI is decreased when cells are exposed to LDL, mildly and standardly oxLDL. This is in accordance with Han et al. (2001) who also observed that exposure of oxLDL (10-50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in macrophages decreases the expression of both SR-BI cytosolic and membrane proteins while it had no effect on the membrane distribution of that protein. Also, it is noteworthy that these macrophages (RAW and J-774) express SR-BI but not caveolin-1 (Matveev et al. 1999, 2001). In cav13 cells, the expression of caveolin-1 prevents the diminution of SR-BI with all three LDL subtypes. We also notice the same effect with LDLr when cells are treated with mildly and standardly oxLDL. In light of those results, we could conclude that caveolin-1 stabilizes SR-BI levels when exposed to all three subtypes of LDL and also LDLr levels when treated with mildly and standardly oxLDL. Our data demonstrate that the expression of CD36 is not affected when control cells and cav13 cells are treated with all three LDL subtypes. These last results are in contradiction with those of Han et al. (1997) showing that J774 cells exposed for 4h to oxLDL have CD36

mRNA levels induced by 8-fold. This discrepancy could be explained by the different cell types investigated but the finding surely deserves further investigation.

In conclusion, our major findings are that the expression of caveolin-1 in HepG2 cells increases the binding and degradation of both mildly and standardly oxLDL, decreased CE-selective uptake from mildly oxLDL and stabilizes SR-BI when exposed to all three subtypes of LDL and the LDLr when treated with mildly and standardly oxLDL. Therefore, caveolin-1 expression in hepatic cells appears beneficial by favoring uptake and degradation of circulating oxLDL and also by stabilizing SR-BI and LDLr levels in the presence of these atherosclerotic lipoproteins.

### Figure Legends

Figure 1: Mildly and standardly oxLDL binding and degradation. Binding and degradation of  $^{125}\text{I}$ -mildly-oxLDL,  $^{125}\text{I}$ -standardly-oxLDL (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to HepG2 cells transfected with the vector pRc/CMV without insert (control cells) (white bars) and Cav13 cells (grey bars). Each result represents the mean percentage  $\pm$  SEM of four to six experiments all conducted in triplicate.

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the results obtained with control cells.

<sup>b</sup> Significantly different ( $p < 0.005$ ) from the results obtained with control cells.

<sup>c</sup> Significantly different ( $p < 0.0001$ ) from the results obtained with control cells.

<sup>d</sup> Significantly different ( $p < 0.005$ ) from the proper degradation of mildly oxLDL.

Figure 2: Mildly oxLDL-CE and standardly oxLDL-CE selective uptake. Association of  $^{125}\text{I}$ -mildly-oxLDL or  $^{125}\text{I}$ -standardly-oxLDL (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), association of  $^3\text{H}$ -CE-mildly-oxLDL or  $^3\text{H}$ -CE-standardly-oxLDL (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and selective uptake of control cells (white bars) and Cav13 cells (grey bars). Each result represents the mean  $\pm$  SEM of four to six experiments all conducted in triplicate.

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the results obtained with control cells.

<sup>b</sup> Significantly different ( $p < 0.005$ ) from the results obtained with control cells.

<sup>c</sup> Significantly different ( $p < 0.0001$ ) from the results obtained with control cells.

<sup>d</sup> Significantly different ( $p < 0.005$ ) from the proper association of mildly oxLDL.

<sup>e</sup> Significantly different ( $p < 0.0001$ ) from the proper association of mildly oxLDL.

Figure 3: Cholesterol efflux. Efflux of [ $^3\text{H}$ ]-cholesterol to LDL, mildly oxLDL and standardly oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on control cells (white bars) and HepG2 cells expressing caveolin-1 (grey bars). Each result represents the mean percentage  $\pm$  SEM of four experiments all conducted in triplicate

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the results obtained with control cells.

<sup>b</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the proper efflux of LDL.

<sup>c</sup> Significantly different ( $p < 0.005$ ) from the proper efflux of LDL.

<sup>d</sup> Significantly different ( $p < 0.0001$ ) from the proper efflux of oxLDL.

Figure 4 Expression of SR-BI (A), LDLr (B), CD36 (C) and caveolin-1 (D) treated with different concentration (0 to 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) of native LDL, mildly oxLDL and standardly oxLDL in control and Cav13 cells. Cells were solubilized as described in the Materials and Methods and 100  $\mu\text{g}$  of protein were subjected to 10% SDS-PAGE. The expression of different proteins was detected after transfer to nitrocellulose using the respective antibody. Representative data from one of three independent experiments.

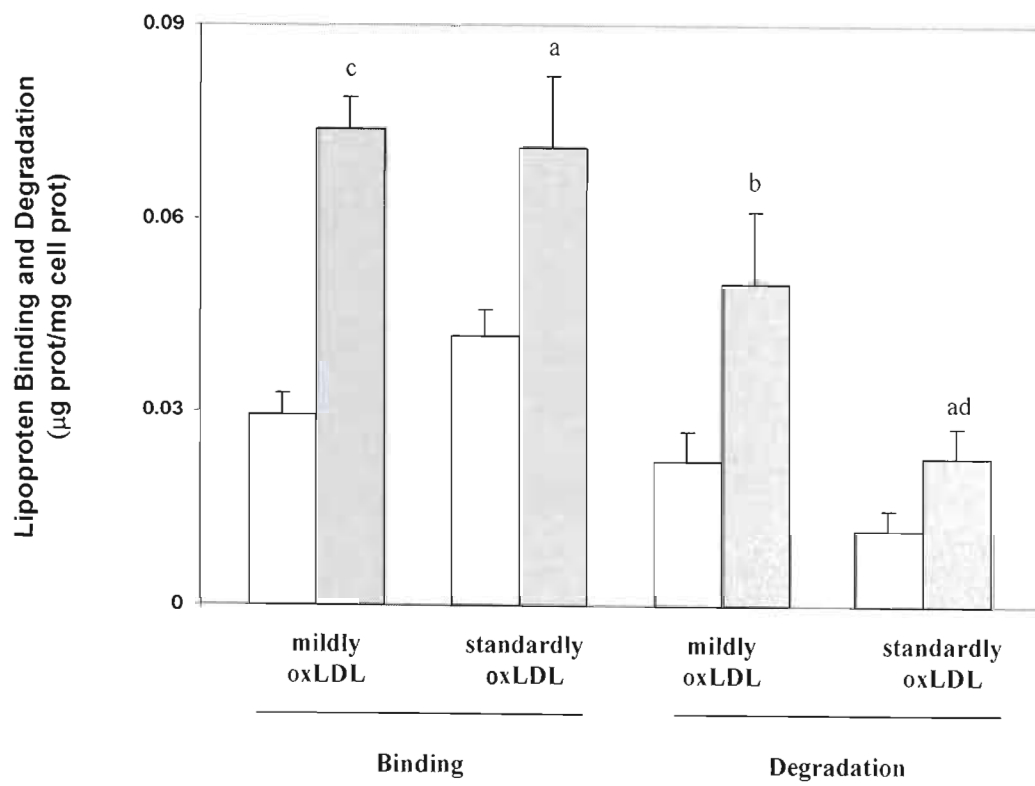


Figure 1

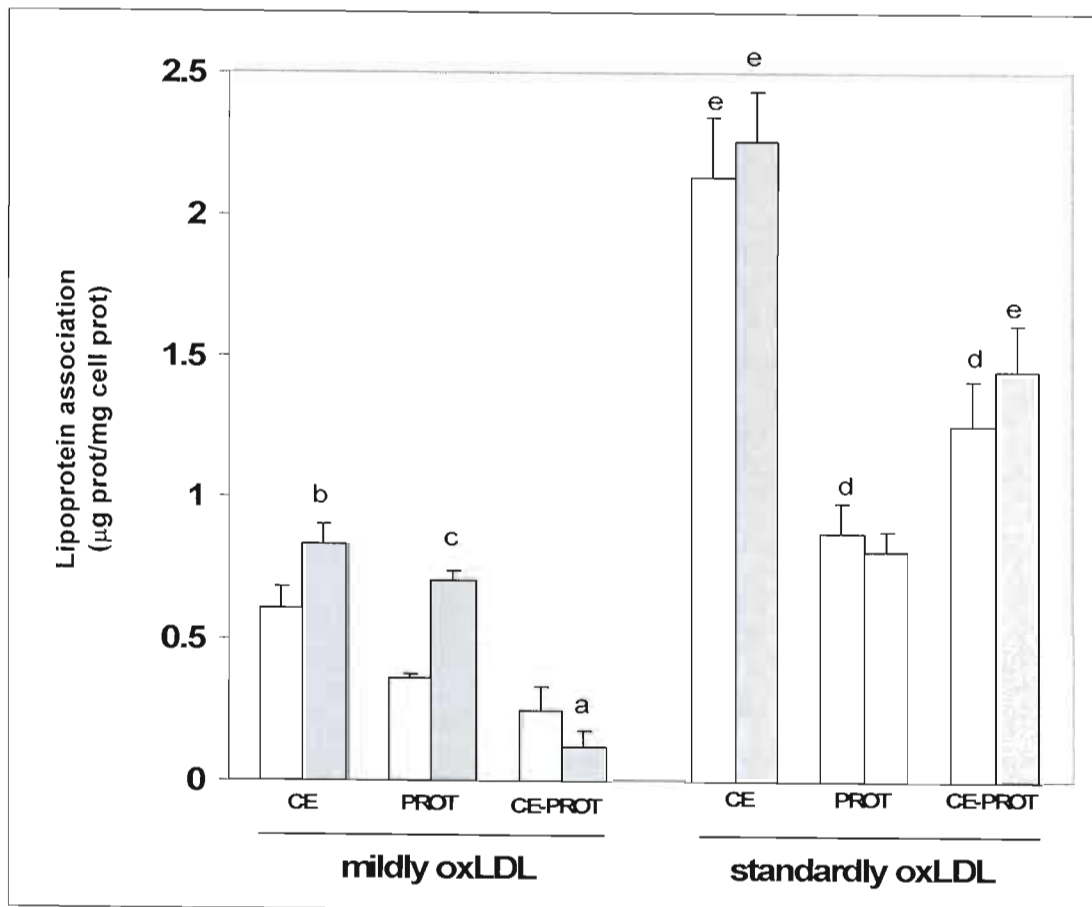


Figure 2

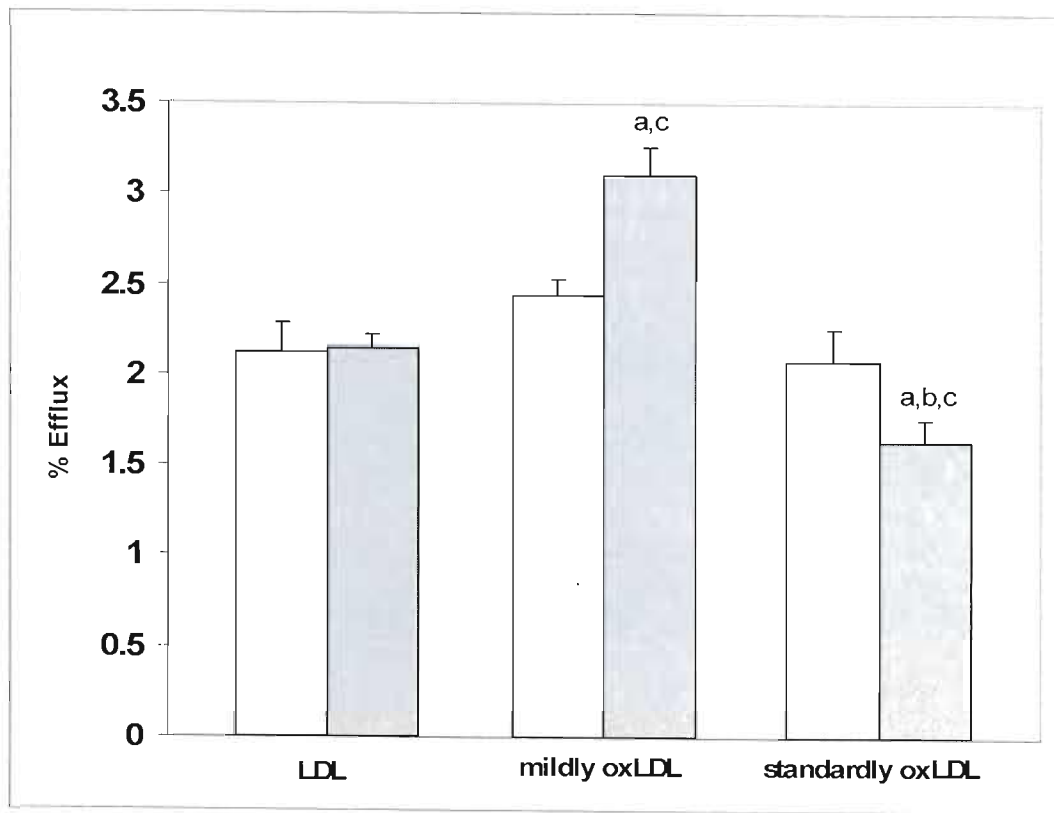


Figure 3

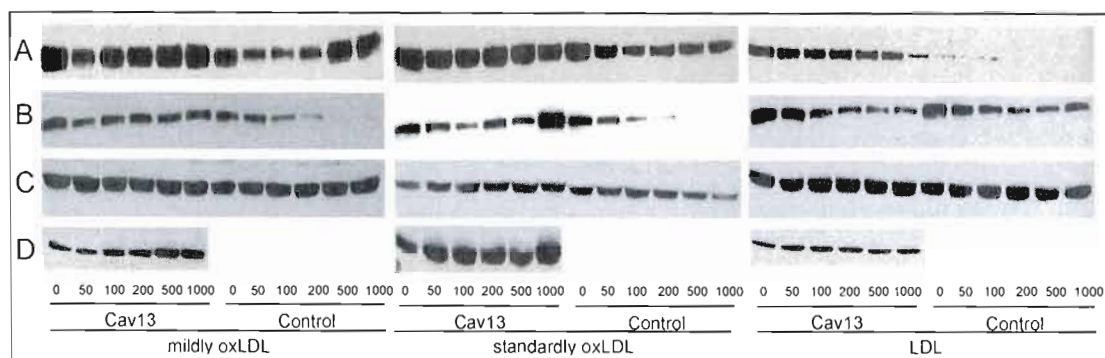


Figure 4



## CHAPITRE 6:

### Conclusion

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont encore la cause primaire de décès dans la plupart des pays industrialisés. Le fardeau des MCV et des accidents vasculaires cérébraux au Canada est sans cesse croissant et pèse sur notre société, tant au plan économique qu'en matière de qualité de vie. De plus, on s'attend à ce que le nombre de cas de MCV augmente au cours des 20 prochaines années. Les canadiens présentent un facteur de risque élevé de développer une MCV : huit personnes sur dix affichent au moins un des facteurs de risque (tabagisme, alcool, sédentarité, obésité, hypertension artérielle, diabète, diète riche en cholestérol ou dyslipidémie) et un canadien sur dix présente trois facteurs de risque ou plus. Ces chiffres sont effrayants et la prévention prime afin de réduire l'incidence de la maladie en contrôlant les facteurs de risque. Ainsi, le laboratoire de Madame Louise Brissette étudie le métabolisme des lipoprotéines, une importance majeure dans la prévalence de cette maladie car il est très bien connu qu'un taux élevé de cholestérol associé aux LDL, un faible taux de cholestérol à partir des HDL et un taux élevé de TG plasmatiques jouent un rôle majeur dans le développement de la maladie.

Les résultats de recherche présentés dans cette thèse démontrent dans un premier temps que, dans un modèle hépatique de souris, la captation sélective des EC peut se faire autant par les cellules parenchymateuses que non parenchymateuses. Cependant, seulement les cellules parenchymateuses peuvent soutirer les EC à partir des trois classes étudiées, soient les HDL, LDL et LDLox tandis que les cellules non parenchymateuses ne peuvent le faire qu'à partir des LDL et LDLox (figure 1). De ceci on ne doit pas déduire que les HDL subissent peu de captation sélective car les cellules parenchymateuses sont 9 fois plus abondantes dans le foie que les cellules non parenchymateuses. De plus, cette étude a démontré que les cellules parenchymateuses expriment plus de rLDL, SR-BI et CD36 que les cellules non parenchymateuses (figure 1). Par contre, seule la cavéoline-1 est détectée dans les cellules non-parenchymateuses, ce qui est en accord avec les études de Malerod et al. (2002). Ainsi, ce groupe a suggéré que la présence de la cavéoline-1 favorise plutôt la voie de l'efflux de cholestérol que celle de la captation sélective des EC au niveau du foie. Pareillement, nos

résultats suggèrent que la présence de la cavéoline-1 dans les cellules non parenchymateuses entraîne une augmentation de l'efflux de cholestérol (figure 1). À la lumière de ces résultats, nous pouvons croire que la vocation des cellules parenchymateuses serait de capter sélectivement les EC tandis que celle des cellules non parenchymateuses serait de retourner du cholestérol en circulation sous la forme de HDL anti-athérogéniques.

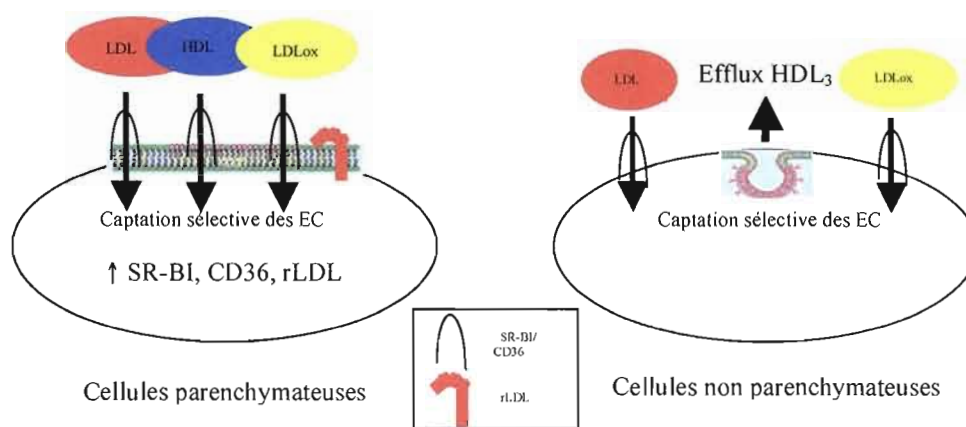


Figure 1: Différences entre les cellules parenchymateuses et cellules non-parenchymateuses. Les cellules parenchymateuses expriment plus de SR-BI, CD36, rLDL (localisés dans les radeaux lipidiques) et participent à la captation sélective des EC à partir des LDL, HDL et LDLox. Les cellules non parenchymateuses médient l'efflux de cholestérol en présence de la cavéoline-1 (localisée dans les cavéoles) et sont capables de soutirer les EC à partir des LDL et LDLox.

En 1997, les travaux de Babitt et al. (1997) démontrent pour la première fois que le SR-BI est colocalisé avec la cavéoline-1 dans les cellules CHO puis plusieurs autres travaux l'ont démontré dans les cellules extra-hépatiques (Graf et al. 1999, Matveev et al. 1999, Frank et al. 2002, Wang et al. 2003). Cependant, peu de chercheurs se sont concentrés sur le rôle potentiel de la cavéoline-1 dans les cellules hépatiques où cette protéine et les structures membranaires qu'elles forment sont peu présentes mais où la protéine SR-BI est fortement exprimée et localisée dans les radeaux lipidiques (Rhainds et al. 2004). Ainsi, lorsque nous avons exprimé la cavéoline-1 dans la cellule hépatique humaine (HepG2), nos résultats ont révélé une augmentation de la captation sélective des EC à partir des HDL de 55% et une diminution pour celle des LDL de 66%. On pourrait dire que ceci va de pair avec les études de chromatographie liquide de haute performance de Razani et al. (2002) qui révèlent que les

souris déficientes en cavéoline-1 démontrent une accumulation du taux de cholestérol dans les chylomicrons et VLDL dans le sang. Par contre, nos résultats ne sont pas corrélés avec une colocalisation importante entre le SR-BI et la cavéoline-1. Ceci indique que la présence de la cavéoline-1 dans la cellule HepG2 ne déplace pas SR-BI vers les cavéoles et qu'une colocalisation entre ces deux protéines n'est pas nécessaire pour susciter une modification dans la captation sélective des EC à partir des HDL et LDL. Or, nos résultats démontrent une augmentation de la forme dimérique du SR-BI lorsque la cavéoline-1 est exprimée. Cette dimérisation de SR-BI peut modifier la structure de ce récepteur pour favoriser les sites de liaison aux HDL et défavoriser ceux des LDL. Cette hypothèse est supportée par plusieurs travaux rapportant que les LDL et HDL se lient à des sites différents de SR-BI (Gu et al. 2000B, Thuahnai et al. 2003). Dans ce cas ci, nos travaux démontrent que la captation sélective des EC des HDL est augmentée et tout comme Reaven et al. (2004) suggèrent que la forme dimérique du SR-BI favorise la captation sélective des EC à partir des HDL. Les travaux de notre groupe ont aussi démontré que le SR-BI est responsable à 80% de la captation sélective des EC des LDL chez les cellules HepG2 et les cultures primaires de cellules hépatiques de souris (Rhains et al. 2003). De plus, notre groupe a rapporté que les souris déficientes en SR-BI démontrent une inhibition complète pour la captation sélective des EC-LDL dans la première phase de clairance (Brodeur et al. 2005). Ceci suggère que le SR-BI est important dans la voie de captation sélective des EC des LDL. Or, nos résultats révèlent pour la première fois que la forme dimérique de SR-BI est néfaste pour la voie de captation sélective des EC des LDL. Enfin, la captation sélective des EC des HDL et la dégradation des LDL sont augmentées, des effets clairement anti-athérogènes. Par contre, est-ce que la diminution de captation sélective des EC des LDL observée lorsque la cavéoline-1 est exprimée au foie est favorable ou non à l'organisme? Il est encore impossible de répondre avec assurance à cette question puisque nous ne savons pas à ce jour si la captation sélective des EC à partir des LDL est bénéfique ou non pour l'organisme. Ainsi, d'après nos résultats, la présence de la cavéoline-1 dans les cellules hépatiques entraînerait une augmentation de LDL-cholestérol en circulation (due à une augmentation de la forme dimérique de SR-BI et à une réduction de captation sélective), et ainsi élèverait le risque de développement de MCV. D'autre part, on peut penser qu'il soit bénéfique de réduire le taux de captation sélective des EC des des LDL en exprimant la cavéoline-1 hépatique si cette voie mène à la formation de

LDL plus petites et denses à cause de la perte d'EC, car ce type de LDL est généralement associé au phénotype B qui est souvent combiné avec une diminution des niveaux de HDL, une augmentation des TG et une plus grande sensibilité à l'oxydation (Austin et al. 1988, de Graaf et al. 1991). Ce phénotype est souvent le résultat spécifique de traits héréditaires (Superko 1996) et plusieurs groupes ont démontré que les LDL de petites tailles et denses sont corrélées positivement avec le développement des MCV (Gardner et al. 1996, Stampfer et al. 1996, Lamarche et al. 1997, 1998). Donc si la captation sélective génère ce type de LDL denses, on pourrait conclure qu'une expression hépatique de la cavéoline-1 serait bénéfique à l'organisme en atténuant cette voie envers les LDL. Des expériences actuellement en cours au laboratoire visent à déterminer si les LDL ayant résidées dans la circulation sanguine de rongeurs, donc ayant subies de la captation sélective de leurs EC, sont de ce phénotype. Ainsi leurs tailles, contenus en lipides, états oxydatifs et sensibilités à l'oxydation, et finalement leurs dégradations par le rLDL seront analysés. De plus, puisqu'il y a beaucoup plus de LDL chez l'humain que chez les rongeurs (modèle *in vivo* à partir duquel le rôle physiologique de SR-BI a été élucidé), il est évident qu'il est tout à fait primordial d'éclaircir l'effet physiologique de la captation sélective sur le métabolisme subséquent des LDL.

L'efflux de cholestérol est un processus essentiel dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol cellulaire. Le transport inverse du cholestérol a d'abord été reconnu comme un transport unidirectionnel du cholestérol des macrophages vers le foie. Or, l'efflux du cholestérol par les macrophages ne représente qu'une petite fraction de l'efflux du cholestérol cellulaire total, et Lewis & Rader (2005) ont récemment suggéré de le renommer: transport inverse du cholestérol médié par les macrophages. Les cellules hépatiques étaient considérées auparavant comme des sites pour médier l'influx de cholestérol, i.e. la captation sélective des EC. Peu d'études ont été rapportées sur la capacité des cellules du foie à générer de l'efflux de cholestérol. Désormais, nous savons que le foie génère une quantité substantielle de cholestérol, une source significative de lipitation de particules de HDL natives nouvellement sécrétées (Lewis & Rader 2005). Nos études démontrent que dans les cellules HepG2, les surexpressions de SR-BI, de CD36 et de la cavéoline-1 génèrent toutes une augmentation de l'efflux de cholestérol. De plus, une double surexpression de SR-BI et cavéoline-1 ou CD36

et cavéoline-1 induit une hausse plus importante de l'efflux de cholestérol (voir chapitre 4). Ainsi, ces résultats suggèrent qu'autant le SR-BI que le CD36 dans les cellules HepG2 sont capables de médier l'efflux du cholestérol et que de plus, la présence de la cavéoline-1 contribuerait davantage à cet effet. Nos travaux sur l'efflux de cholestérol dans les cellules hépatiques de souris déficientes en SR-BI ou CD36 démontrent que seul le SR-BI murin est impliqué dans cette voie. De plus, nos résultats révèlent que la forme mature de CD36 est presque inexistante chez la souris normale et ceux de certains chercheurs suggèrent que ce récepteur est localisé dans un compartiment intracellulaire (Muller et al. 2002, Ring et al. 2006). À la lumière de ces résultats, nous pouvons penser que CD36 n'est pas nécessaire au niveau hépatique chez la souris et qu'il joue un rôle mineur dans le processus de l'efflux de cholestérol. En revanche, seule la forme mature, glycosylée de CD36 (82 kDa) a un impact sur le processus de l'efflux de cholestérol, comme observé dans les cellules hépatiques humaines (chapitre 4).

C'est en 1984 que les chercheurs ont démontré que l'oxydation des LDL est reliée à la formation des cellules spumeuses et que de telles LDL ont des propriétés proathérogéniques (Steinbrecher et al. 1984). À l'heure actuelle, une seule étude a rapporté que la cavéoline-1 n'est pas impliquée dans l'endocytose des LDLox médiée par CD36 (Zeng et al. 2003). Cependant, cette étude a été réalisée sur des cellules extrahépatiques. Nos études présentées dans cette thèse démontrent que la cavéoline-1 a le potentiel d'augmenter autant la liaison que la dégradation des LDL légèrement (LDL<sub>lox</sub>) et fortement oxydées (LDL<sub>fox</sub>) (figure 2). Par contre, la présence de la cavéoline-1 affecte seulement la captation sélective des EC des LDL<sub>lox</sub> en la diminuant. Il semble qu'ici l'importance physiologique de l'expression de la cavéoline-1 au foie est définitivement dans le rôle de l'épuration (dégradation) de ces particules athérogéniques, puisqu'il est à prévoir qu'*in vivo* peu de captation sélective se produise en raison de la rapidité avec laquelle ces particules disparaissent de la circulation sanguine pour se retrouver dans le foie. Nous avons démontré auparavant chez les cellules HepG2 exprimant la cavéoline-1 qu'il existe une prédominance de colocalisation entre le CD36 et la cavéoline-1 (chapitre 3), nous suggérons donc que l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules HepG2 régule l'activité de CD36 pour la liaison et la dégradation des LDLox (lox et fox) et la captation sélective des EC des LDLox (lox seulement). Enfin,

l'expression de la cavéoline-1 stabilise l'expression des SR-BI et rLDL lorsque les cellules HepG2 sont traitées avec les LDLox (lox et fox) mais n'a pas d'impact sur celle de CD36. Ceci nous laisse croire que l'expression de la cavéoline-1 est bénéfique à l'organisme puisqu'elle favorise la liaison et la dégradation des LDLox circulantes et aussi stabilise les niveaux de SR-BI et de rLDL en présence de ces lipoprotéines athérogènes.

En somme, l'ensemble des travaux rapportés dans cette thèse supporte qu'une éventuelle expression de la cavéoline-1 au niveau hépatique aurait un rôle clé dans le transport inverse du cholestérol pour maintenir l'homéostasie de la cellule. Elle peut moduler l'efflux de cholestérol vers des accepteurs extracellulaires et l'influx de cholestérol généré par le phénomène de captation sélective des EC et ce à partir des HDL, LDL et LDLox. L'importance de la cavéoline-1 chez l'humain reste à être démontrée. Bien que les souris déficientes en cavéoline-1 sont moins susceptibles à l'athérosclérose que celles déficientes en apoE (Frank et al. 2004), cette protéine demeure un candidat de choix pour la compréhension du métabolisme du cholestérol puisqu'il y a une interaction possible entre elle et les récepteurs hépatiques comme SR-BI et CD36. Nos résultats démontrent que l'expression de la cavéoline-1 n'entraîne pas une colocalisation significative entre celle-ci et le SR-BI. Or, nous suggérons que la présence de la cavéoline-1 dans les cellules hépatiques permet de transmettre un signal soit par activation d'une protéine ancrée dans les radeaux lipidiques et ainsi favorise la dimérisation de SR-BI. D'autre part, nous avons observé une augmentation de l'efflux de cholestérol, ce qui suggère que l'expression de la cavéoline-1 agit sur l'activité de SR-BI et entraîne une réduction du cholestérol à la surface membranaire. On pourrait aussi avancer l'idée que l'expression de la cavéoline-1 peut moduler l'activité des transporteurs comme ABCA1 ou ABCG1 et promouvoir l'efflux de cholestérol. Enfin, nous avons vu que l'expression de la cavéoline-1 augmente la dégradation des LDL et LDLox (lox et fox), diminue la captation sélective des EC à partir des LDL et LDLox mais augmente celle des HDL (figure 2). D'après ces résultats, la cavéoline-1 exprimée dans les cellules hépatiques est bénéfique à l'organisme puisqu'elle participe à l'épuration des LDL et LDLox. Ainsi, nous pouvons penser à d'autres stratégies *in vivo*, comme par exemple injecter des adénovirus de la cavéoline-1 à des souris pour évaluer la disparition des LDL et HDL au niveau du foie. De plus, l'utilisation de souris déficientes en SR-BI ou CD36 serait aussi fort

utile pour évaluer si l'un ou l'autre des récepteurs hépatiques est impliqué dans le métabolisme des LDL, HDL et LDLox.

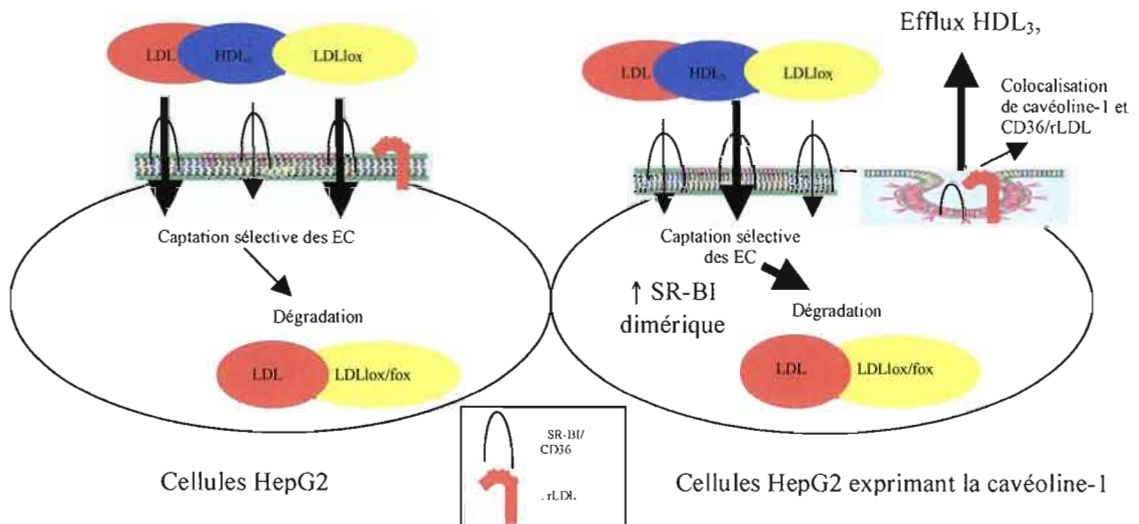


Figure 2: Différences entre les cellules HepG2 et cellules HepG2 exprimant la cavéoline-1. En absence de la cavéoline-1, les cellules HepG2 favorisent la captation sélective des EC à partir des LDL et LDLox. En présence de la cavéoline-1, les cellules HepG2 médient l'efflux de cholestérol à partir des HDL et LDLox en plus de faire la captation sélective des EC à partir des HDL. De plus, l'expression de la cavéoline-1 augmente la forme dimérique de SR-BI. Enfin, l'expression de la cavéoline-1 hépatique augmente la dégradation des LDL et des deux classes de LDLox (lox et fox).



## RÉFÉRENCES

- Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., et Grimaldi, P.A. 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* 268: 17665-17668.
- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., et Krieger, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-520.
- Acton, S., Scherer, P.E., Lodish, H.F., et Krieger, M. 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger-receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 21003-21009.
- Alaupovic, P. 1972. *Dans* Proceeding of the XIX Annual Colloquium on protides of the biological fluids. Pergamon Press, New-York.
- Anderson, R.G. 1993. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10909-10913.
- Anderson, R.G. 1998. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:199-225.
- Anderson, R.G., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1977. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10: 351-364.
- Anderson, R.G., Goldstein, J.L., et Brown, J.L. 1975. Localization of low density lipoprotein receptor on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence absence in cells from familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2434-2438.
- Anderson, R.G., Kamen, B.A., Rothberg, K.G., et Lacey, S.W. 1992. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 255: 410-411.
- Arai, T., Wang, N., Bezouevski, M., Welch, C., et Tall, A.R. 1999. Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene. *J. Biol. Chem.* 274: 2366-2371.



- Aravamudan, B., Volonte, D., Ramani, R., Gursoy, E., Lisanti, M.P., London, B., et Galbiati, F. 2003. Transgenic overexpression of caveolin-3 in the heart induces a cardiomyopathic phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 12: 2777-2788.
- Arbeeny, C.M., Rifichi, V.A., et Eder, H.A. 1987. The uptake of the apoprotein and cholesteryl esters of high density lipoprotein by the perfused rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 917: 9-17.
- Armesilla, A.L., et Vega, M.A. 1994. Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 1994 269: 18985-18991.
- Assman, G., von Eckardstein, A., et Brewer, H.B. Jr. 1995. Familial high density lipoprotein deficiency: Tangier disease. Dans *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Editeurs Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., et Valle, D. McGraw-Hill Inc. New York. pp. 2053-2072.
- Asztalos, B.F., de la Llera-Moya, M., Dallal, G.E., Horvath, K.V., Schaefer, E.J., et Rothblat, G.H. 2005. Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 46: 2246-2253.
- Auger, A., Truong, T.Q., Rhains, D., Lapointe, J., Letarte, F., et Brisette, L. 2001. Low and high density lipoprotein metabolism in primary cultures of hepatic cells from normal and apolipoprotein E knockout mice. *Eur. J. Biochem.* 268: 2322-2330.
- Austin, M.A., Breslow, J.L., Hennekens, C.H., Buring, J.E., Willett, W.C., et Krauss, R.M. 1988. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 260: 1917-1921.
- Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G., Xu, S., et Krieger, M. 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* 272: 13242-13249.
- Basso, F., Freeman, L., Knapper, C.L., Remaley, A., Stonik, J., Neufeld, E.B., Tansey, T., Amar, M.J, Fruchart-Najib, J., Duverger, N., Santamarina-Fojo, S., et Brewer, H.B. Jr. 2003. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res.* 44:296-302.

- Bauer, B.E., Wolfger, H., et Kuchler, K. 1999. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 217-236.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J., et Stanley, K.K. 1989. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341:162-164.
- Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D., et Lusis, A.J. 1995. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91: 2488-2496.
- Bist, A., Fielding, P.E., et Fielding, C.J. 1997. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10693-10698.
- Bonne-Tamir, B., DeStefano, A.L., Briggs, C.E., Adair, R., Franklyn, B., Weiss, S., Korostishevsky, M., Frydman, M., Baldwin, C.T., et Farrer, L.A. 1996. Linkage of congenital recessive deafness (gene DFNB10) to chromosome 21q22.3. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 1254-1259.
- Bortnick, A.E., Rothblat, G.H., Stoudt, G., Hoppe, K.L., Royer, L.J., McNeish, J., et Francone, O.L. 2000. The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J. Biol. Chem.* 275: 28634-28640.
- Bourret, G., Brodeur, M.R., Luangrath, V., Lapointe, J., Falstraull, L., et Brissette, L. 2006. In vivo cholesteryl ester selective uptake of mildly and standardly oxidized LDL occurs by both parenchymal and nonparenchymal mouse hepatic cells but SR-BI is only responsible for standardly oxidized LDL selective uptake by nonparenchymal cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38:1160-1170.
- Brissette, L., Charest, M.C., et Falstraull, L. 1996. Selective uptake of cholesteryl ester of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein-binding site in HepG2 cells and is followed by the hydrolysis of cholesteryl esters. *Biochem. J.* 318: 841-847.
- Brissette, L., Charest, M.C., Falstraull, L., Lafond, J., Rhains, D., et Truong, T.Q. 1999. Selective uptake of cholesteryl esters from various classes of lipoproteins by HepG2 cells is inversely correlated with the total lipid/protein ratios of the lipoproteins. *Biochem. Cell Biol.* 77:157-63.

- Brissette, L., et Noël, S.P. 1986. The effects of human low and high density lipoproteins on the binding of rat intermediate density lipoproteins to rat liver membranes. *J. Biol. Chem.* 261: 6847-6852.
- Brissette, L., Roach, P.D., et Noël, S.P. 1986. The effect of liposomes-reconstituted apolipoproteins on the binding of rat intermediate density lipoproteins to rat liver membranes. *J. Biol. Chem.* 261: 11631-11638.
- Broccardo, C., Luciani, M., et Chimini, G. 1999. The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 395-404.
- Broccardo, C., Luciani, M., et Chimini, G. 1999. The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 395-404.
- Brodeur, M.R., Luangrath, V., Bourret, G., Falstraalt, L., et Brissette, L. 2005. Physiological importance of SR-BI in the in vivo metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J. Lipid Res.* 46: 687-696.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., Loubser, O., Ouelette, B.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J., Genest, J. Jr. et Hayden, M.R. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 22: 336-345.
- Brousseau, M.E., Eberhart, G.P., Dupuis, J., Asztalos, B.F., Goldkamp, A.L., Schaefer, E.J., et Freeman, M.W. 2000. Cellular cholesterol efflux in heterozygotes for tangier disease is markedly reduced and correlates with high density lipoprotein cholesterol concentration and particle size. *J. Lipid Res.* 41: 1125-1135.
- Brown, D., et Rose, J.K. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-544.
- Brown, D., et Waneck, G.L. 1992. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3: 895-906.
- Brown, M.S., Dana, S.E., et Goldstein, J.L. 1973. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase site. Activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2162-2166.

- Brown, M.S., Dana, S.E., et Goldstein, J.L. 1974. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 249: 789-796.
- Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1983. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J. Clin. Invest.* 72: 743-747.
- Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., Krieger, M., Ho, Y.K., et Anderson, R.G. 1979. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J. Cell Biol.* 82: 597-613.
- Brown, W.V., et Baginsky, M.L. 1972. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46: 375-382.
- Brundert, M., Heeren, J., Greten, H., et Rinninger, F. 2003. Hepatic lipase mediates an increase in selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters by cells in culture independent from SR-BI. *J. Lipid Res.* 44: 1020-1032.
- Cai, S.F., Kirby, R.J., Howles, P.N., et Hui, D.Y. 2001. Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J. Lipid Res.* 42: 902-909.
- Calvo, D., Dopazo, J., et Vega, M.A. 1995. The CD36, CLA-I (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics* 25:100-106.
- Calvo, D., et Vega, M.A. 1993. Identification, primary structure, and distribution of CLA-I, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J. Biol. Chem.* 268: 18929-18935.
- Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Lascuncion, M.A., et Vega, M.A. 1997. CLA-I is an 85-kDa plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 2341-2349.
- Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M.A., et Vega, M.A. 1998. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J. Lipid Res.* 39: 777-788.

- Cao, G., Garcia, C.K., Wyne, K.L., Schultz, R.A., Parker, K.L., et Hobbs, H.H. 1997. Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-I. Evidence for a transcriptional control by steroidogenic factor. *J. Biol. Chem.* 272: 33068-33076.
- Carbone, I., Bruno, C., Sotgia, F., Bado, M., Broda, P., Maetti, E., Panella, A., Zara, F., Bricarelli, F.D., Cordone, G., Lisanti, M.P., et Minetti, C. 2000. Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology* 54: 1373-1376.
- Chang, W.J., Ying, Y.S., Rothberg, K.G., Hooper, N.M., Turner, A.J., Gambliel, H.A., De Gunzburg, J., Mumby, S.M., Gilman, A.G., et Anderson, R.G. 1994. Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell. Biol.* 126: 127-138.
- Chapman, M.J., Guerin, M., et Bruckert, E. 1998. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur. Heart J.* 19: A24-30.
- Charest, M.C., Rhinds, D., Falstraalt, L., Matzouranis, T., et Brissette, L. 1999. Selective uptake of cholesteryl ester from low density lipoprotein is involved in HepG2 cell cholesterol homeostasis. *Eur. J. Biochem.* 263: 402-409.
- Charpentier, D., Tremblay, C., Rassart, E., Rhinds, D., Auger, A., Milne, R.W., et Brissette, L. 2000. Low- and high-density lipoprotein metabolism in HepG2 cells expressing various levels of apolipoprotein E. *Biochemistry* 39: 16084-16091.
- Chen, H., Rossier, C., et Antonarakis, S.E. 1996. Cloning of a human homolog of the *Drosophila* enhancer of zeste gene (EZH2) that maps to chromosome 21q22.2. *Genomics* 8: 30-37.
- Chen, W., Silver, D.L., Smith, J.D., et Tall, A.R. 2000. Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1-mediated cholesterol efflux in macrophages. *J. Biol. Chem.* 275: 30794-30800.
- Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A.R., Tabas, I., et Tall, A.R. 2001. Preferential ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes. *J. Biol. Chem.* 276: 43564-43569.
- Cherradi, N., Bideau, M., Arnaudeau, S., Demaurex, N., James, R.W., Azhar, S., et Capponi, A.M. 2001. Angiotensin II promotes selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters in bovine adrenal glomerulosa and human adrenocortical carcinoma

- cells through induction of scavenger receptor class B type I. *Endocrinology* 142: 4540-4549.
- Chisolm, G.M., et Steinberg, D. 2000. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis : an overview. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1815-1826.
- Cohen, A.W., Park, D.S., Woodman, S.E., Williams, T.M., Chandra, M., Shirani, J., Pereira de Souza, A., Kitsis, R.N., Russell, R.G., Weiss, L.M., Tang, B., Jelicks, L.A., Factor, S.M., Shtutin, V., Tanowitz, H.B., et Lisanti, M.P. 2003. Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284: C457-C474.
- Connelly, M.A., Kellner-Weibel, G., Rothblat, G.H., et Williams, D.L. 2003. SR-BI-directed HDL-cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* 44: 331-341.
- Connelly, M.A., Klein, S.M., Azhar, S., Abumrad, N.A., et Williams, D.L. 1999. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J. Biol. Chem.* 274: 41-47.
- Croop J.M., Tiller, G.E., Fletcher, J.A., Lux, M.L., Raab, E., Goldenson, D., Son, D., Arciniegas, S., et Wu, R.L. 1997. Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila* white gene. *Gene* 185: 77-85.
- Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., et Fogelman, A.M. 1990. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5134-5138.
- Daoust, R., et Cantero, A. 1959. The distribution of deoxyribonuclease in normal, cirrhotic and neoplastic rat livers. *J. Histochem. Cytochem.* 7: 139-143.
- Dashti, N., et Wolbauer, G. 1986. Studies on the binding and degradation of human very-low-density lipoproteins by human hepatoma cell line HepG2. *Biochim. Biophys. Acta* 875: 473-483.
- Daviet, L., Malvoisin, E., Wild, T.F., et McGregor, J.L. 1997. Thrombospondin induces dimerization of membrane-bound, but not soluble CD36. *Thromb. Haemost.* 78:897-901.

- de Graaf, J., Hak-Lemmers, H.L., Hectors, M.P., Demacker, P.N., Hendriks, J.C., et Stalenhoef, A.F. 1991. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler. Thromb.* 11: 298-306.
- de la Llera-Moya, M., Rothblat, G.H., Connelly, M.A., Kellner-Weibel, G., Sakr, S.W., Phillips, M.C., et Williams, D.L. 1999. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.* 40: 575-580.
- de Villiers, W.J., Cai, L., Webb, N.R., de Beer, M.C., van der Westhuyzen, D.R., et de Beer, F.C. 2001. CD36 does not play a direct role in HDL or LDL metabolism. *J. Lipid Res.* 42:1231-1238.
- de Villiers, W.J.S., et Smart, E. J. 1999. Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J. Leukoc. Biol.* 66: 740-746.
- DeBose-Boyd, R.A., Brown, M.S., Li, W.P., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., et Espenshade, P.J. 1999. Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* 99: 703-712.
- Decottignies, A., et Goffeau, A. 1999. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* 15: 137-145.
- Dietzen, D.J., Hastings, W.R., et Lublin, D.M. 1995. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* 270: 6838-6842.
- Dixon, J.L., et Ginsberg, H.N. 1993. Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J. Lipid Res.* 34: 167-179.
- Dorahy, D.J., Lincz, L.F., Meldrum, C.J., et Burns, G.F. 1996. Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. *Biochem. J.* 319: 67-72.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., Schedl, A., Haller, H., et Kurzchalia, T.V. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-2452.

- Drobnik, W., Lindenthal, B., Lieser, B., Ritter, M., Christiansen-Weber, T., Liebisch, G., Giesa, U., Igel, M., Borsukova, H., Buchler, C., Fung-Leung, W.P., Von Bergmann, K., et Schmitz, G. 2001. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) affects total body sterol metabolism. *Gastroenterology* 120: 1203-1211.
- Duncan, K.G., Bailey, K.R., Kane, J.P., et Schwartz, D.M. 2002. Human retinal pigment epithelial cells express scavenger receptors BI and BII. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292: 1017-1022.
- Eckhardt, E.R., Cai, L., Shetty, S., Zhao, Z., Szanto, A., Webb, N.R., et van der Westhuyzen, D.R. 2006. High density lipoprotein endocytosis by scavenger receptor SR-BII is clathrin-dependent and requires a carboxyl-terminal dileucine motif. *J. Biol. Chem.* 281:4348-4353.
- Eckhardt, E.R., Cai, L., Sun, B., Webb, N.R., et van der Westhuyzen, D.R. 2004. High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *J. Biol. Chem.* 279:14372-14381.
- Endelmann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., et Protter, A.A. 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268: 11811-11816.
- Engelman, J.A., Wykoff, C.C., Yasuhara, S., Song, K.S., Okamoto, T., Lisanti, M.P. 1997. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J. Biol. Chem.* 272: 16374-16381.
- Engelman, J.A., Zhang, X., Galbiata, F., Volonte, D., Sotgia, F., Pestell, R.G., Minetti, C., Scherer, P.E., Okamoto, T., et Lisanti, M.P. 1998. Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 1578-1587.
- Everson, W.V., et Smart, E.J. 2001. Influence of caveolin, cholesterol, and lipoproteins on nitric oxide synthase: implications for vascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 11: 246-250.
- Febbraio, M., Abumrad, N.A., Hajjar, D.P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S.F., et Silverstein, R.L. 1999. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* 274: 19055-19062.



- Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., et Silverstein, R.L. 2000. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J. Clin. Invest.* 105: 1049-1056.
- Fernandez-Ruiz, E., Armesilla, A.L., Sanchez-Madrid, F., et Vega, M.A. 1993. Gene encoding the collagen type I and thrombospondin receptor CD36 is located on chromosome 7q11.2. *Genomics* 17: 759-761.
- Fidge, N.H. 1999. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J. Lipid Res.* 40:187-201.
- Fielding, C.J., et Fielding, P.E. 1997. Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 38: 1503-1521.
- Fielding, C.J., et Fielding, P.E. 2001. Cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1533: 175-189.
- Fielding, C.J., Shore, P.E., et Fielding, P.E. 1972. A protein cofactor of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46: 1493-1498.
- Fielding, P.E., et Fielding, C.J. 1995A. Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry* 34: 14237-14244.
- Fielding, P.E., et Fielding, C.J. 1995B. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* 34: 14288-14292.
- Fielding, P.E., et Fielding, C.J. 1995C. Role of an N-ethylmaleimide-sensitive factor in the selective cellular uptake of low-density lipoprotein free cholesterol. *Biochemistry* 34: 14237-14244.
- Fielding, P.E., et Fielding, C.J. 1996. Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry* 35: 14932-14938.
- Fluiter, K., van der Westhuijzen, D.R., et van Berkel, T.J. 1998. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J. Biol. Chem.* 273:8434-8438.

- Fong, B.S., et Angel, A. 1989. Transfer of free and esterified cholesterol from low-density lipoproteins and high lipoproteins to human adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1004: 53-60.
- Forte, T., et Nichols, A.V. 1972. Application of electron microscopy to the study of plasma protein structure. *Adv. Lipid Res.* 10: 1-38.
- Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K., et Parton, R.G. 1994. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J. Biol. Chem.* 269: 30745-30748.
- Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K., et Parton, R.G. 1995. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8655-8659.
- Frank, P.G., Cheung, M.W., Pavlides, S., Llaverias, G., Park, D.S., et Lisanti, M.P. 2006. Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291: H677-H686.
- Frank, P.G., Galbiati, F., Volonte, D., Razani, B., Cohen, D.E., Marcel, Y.L., et Lisanti, M.P. 2001A. Influence of caveolin-1 on cellular cholesterol efflux mediated by high-density lipoproteins. *Am. J. Physiol.* 280: 1204-1214.
- Frank, P.G., Lee, H., Park, D.S., Tandon, N.N., Scherer, P.E., et Lisanti, M.P. 2004. Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 98-105.
- Frank, P.G., Marcel, Y.L., Connelly, M.A., Lublin, D.M., Franklin, V., Williams, D.L., et Lisanti, M.P. 2002. Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. *Biochemistry* 41: 11931-11940.
- Frank, P.G., Pedraza, A., Cohen, D.E., et Lisanti, M.P. 2001B. Adenovirus-mediated expression of caveolin-1 in mouse liver increases plasma high-density lipoprotein levels. *Biochemistry* 40: 10892-10900.
- Fredenrich, A., Giroux, L.M., Tremblay, M., Davignon, J., et Cohn, J.S. 1997. Plasma lipoprotein distribution of apoC-III in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects: Comparison of the apoC-III to apoE ratio in different lipoprotein fractions. *J. Lipid Res.* 38: 1421-1432.

- Fredrickson, D.S. 1964. The inheritance of high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *J. Clin. Invest.* 43: 228.
- Fredrickson, D.S. Altrocchi, P.H. Avioli, L.V., Goodman, D.S., et Goodman, H.C. 1961. Tangier disease-combined clinical staff conference at the National Intititutes of Health. *Ann. Int. Med.* 55: 1016.
- Freeman, M., Ekkel, Y., Rohrer, L., Penman, M., Freedman, N.J., Chisolm, G.M., et Krieger, M. 1991. Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4931-4935.
- Fu, Y., Hoang, A., Escher, G., Parton, R.G., Krozowski, Z., et Sviridov, D. 2004. Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J. Biol. Chem.* 279: 14140-14146.
- Fujimoto, T., Kogo, H., Nomura, R., et Une, T. 2000. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J. Cell Sci.* 113: 3509-3517.
- Galbiati, F., Engelman, J.A., Volonte, D., Zhang, X.L., Minetti, C., Li, M., Hou, H. Jr, Kneitz, B., Edelmann, W., et Lisanti, M.P. 2001 Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276: 21425-21433.
- Gardner, C.D, Fortmann, S.P., et Krauss, R.M. 1996. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA* 276: 875-881.
- Gillotte, K.L., Zaiou, M., Lund-Katz, S., Anantharamaiah, G.M., Holvoet, P., Dhoest, A., Palgunachari, M.N., Segrest, J.P., Weisgraber, K.H., Rothblat, G.H., et Phillips, M.C. 1999. Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolubilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *J. Biol. Chem.* 274: 2021-2028.
- Glass, C., Pittman, R.C., Civen, M., et Steinberg, D. 1985. Uptake of high density lipoprotein-associated apoprotein A-1 and cholesteryl esters by 16 tissues of the rat *in vivo* and by adrenal cells and hepatocytes *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 260: 744-750.

- Glatz, J.F., Van Nieuwenhoven, F.A., Luiken, J.J., Schaap, F.G., et Van Der Vusse, G.J. 1997. Role of membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in cellular fatty acid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 57: 373-378.
- Glenney, J.R. Jr, et Soppet, D. 1992. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10517-10521.
- Glenney, J.R. Jr, et Zokas, L. 1989. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 108: 2401-2408.
- Glenney, J.R. Jr. 1989. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* 264: 20163-20166.
- Glenney, J.R. Jr. 1992. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett.* 314: 45-48.
- Glomset, J.A. 1968. The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.* 9: 155-167.
- Goldberg, I.J., Scheraldi, C.A., Yacoub, L.K., Saxena, U. et Bisgaier, C.L. 1990. Lipoprotein apo C-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J. Biol. Chem.* 265: 4266-4272.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W., et Schneider, W.J. 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 1-39.
- Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1985. The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism. *J. Cell Sci. Suppl.* 3: 131-137.
- Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1989. *Dans* The metabolic basis of inherited disease. Volume 1. 6<sup>e</sup> édition. Ed. Scriver, C.R., Beaudet, A., Sly, W.S., Valle, D. McGraw Hill, New York. pp: 1215-1250.
- Goldstein, J.L., Kita, T., et Brown, M.S. 1983. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 309: 288-296.
- Goti, D., Hrzenjak, A., Levak-Frank, S., Frank, S., van der Westhuyzen, D.R., Malle, E., et Sattler, W. 2001. Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain

- capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E. *J. Neurochem.* 76: 498-508.
- Graf, G.A., Connell, P.M., van der Westhuyzen, D.R., et Smart, E.J. 1999. The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters into caveolae. *J. Biol. Chem.* 274: 12043-11048.
- Graf, G.A., Roswell, K.L., et Smart, E.J. 2001. 17 $\beta$ -Estradiol promotes the up-regulation of SR-BII in HepG2 cells and in rat livers. *J. Lipid Res.* 42: 1444-1449.
- Green, S.R., et Pittman, R.C. 1991. Selective uptake of cholesteryl esters from low-density lipoprotein *in vitro* and *in vivo*. *J. Lipid Res.* 32: 667-678.
- Greene, D.J., Skeggs, J.W., et Morton, R.E. 2001. Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *J. Biol. Chem.* 276: 4804-4811.
- Greenwalt, D.E., Lipsky, R.H., Ockenhouse, C.F., Ikeda, H., Tandon, N.N., et Jamieson, G.A. 1992. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 80: 1105-1115
- Gu, X., Kozarsky, K., et Krieger, M. 2000A. Scavenger receptor class B, type I-mediated [ $^3$ H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 29993-30001.
- Gu, X., Lawrence, R., et Krieger, M. 2000B. Dissociation of the high density lipoprotein and low density lipoprotein binding activities of murine scavenger receptor class B type I (mSR-BI) using retrovirus library-based activity dissection. *J. Biol. Chem.* 275: 9120-9130.
- Gu, X., Trigatti, B., Xu, S., Acton, S., Babitt, J., et Krieger, M. 1998. The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 273: 26338-26348.
- Hagiwara, Y., Sasaoka, T., Araishi, K., Imamura, M., Yorifuji, H., Nonaka, I., Ozawa, E., et Kikuchi, T. 2000. Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice. *Hum. Mol. Genet.* 9: 3047-3054.

- Han, J., Hajjar, D.P., Febbraio, M., et Nicholson, A.C. 1997. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36, *J. Biol. Chem.* 272: 21654-21659.
- Han, J., Hajjar, D.P., Tauras, J.M., et Nicholson, A.C. 1999. Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *J. Lipid Res.* 40: 830-838.
- Han, J., Nicholson, A.C., Zhou, X., Feng, J., Gotto Jr, A.M., et Hajjar, D.P. 2001. Oxidized low density lipoprotein decreases macrophage expression of scavenger receptor B-I. *J. Biol. Chem.* 276: 16567-16572.
- Harmon, C.M., et Abumrad, N.A. 1993. Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J. Membr. Biol.* 133: 43-49.
- Havekes, L.M., De Wit, E.C.M., et Princen, H.M.G. 1987. Cellular free cholesterol in HepG2 cells is only partially available for down-regulation of low-density-lipoprotein receptor activity. *Biochem. J.* 247: 739-746.
- Havel, R.J., et Hamilton, R.L. 1988. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology* 8: 1689-1704.
- Hendriks, H.F., Brouwer, A., et Knook, D.L. 1990. Isolation, purification, and characterization of liver cell types. *Methods Enzymol.* 190: 49-58.
- Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 67-113.
- Hnasko, R., et Lisanti, M.P. 2003. The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol. Interv.* 3: 445-464.
- Hobbs, H.H., Russell, D.W., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1990. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.* 24: 133-170.
- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., et Wang, X. 1993. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11603-11607.

- Huang, M.M., Bolen, J.B., Banwell, J.W., Shattil, S.J., et Brugge, J.S. 1991. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7844-7848.
- Huang, Z.H., Lin, C.Y., Oram, J.F., et Mazzone, T. 2001. Sterol efflux mediated by endogenous macrophage ApoE expression is independent of ABCA1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 2019-2025.
- Huard, K., Bourgeois, P., Rhainds, D., Falstraull, L., Cohn, J.S., et Brissette L. 2005. Apolipoproteins C-II and C-III inhibit selective uptake of low- and high-density lipoprotein cholesteryl esters in HepG2 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 1308-1318.
- Huh, H.Y., Pearce, S.F., Yesner, L.M., Schindler, J.L., et Silverstein, R.L. 1996. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood* 87: 2020-2028.
- Hui, D.Y., Innrarity, T.L., Milne, R.W., Marcel, Y.L., et Mahley, R.W. 1984. Binding of chylomicron remnants and beta-very low density lipoproteins to hepatic and extrahepatic lipoprotein receptors. A process independent of apolipoprotein B48. *J. Biol. Chem.* 259:15060-15068.
- Huszar, D., Varban, M.L., Rinninger, F., Feeley, R., Arai, T., Fairchild-Huntress, V., Donovan, M.J., et Tall, A.R. 2000. Increased LDL cholesterol and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice with attenuated expression of scavenger receptor B1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1068-1073.
- Ikemoto, M., Arai, H., Feng, D., Tanaka, K., Aoki, J., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M., et Inoue, K. 2000. Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6538-6543.
- Ikezu, T., Ueda, H., Trapp, B.D., Nishiyama, K., Sha, J.F., Volonte, D., Galbiata, F., Byrd, A.L., Bassell, G., Serizawa, H., Lane, W.S., Lisanti, M.P., et Okamoto, T. 1998. Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res.* 804: 177-192.

- Ikezu, T., Ueda, H., Trapp, B.D., Nishiyama, K., Sha, J.F., Volonte, D., Galbiati, F., Byrd, A.L., Bassell, G., Serizawa, H., Lane, W.S., Lisanti, M.P., et Okamoto, T. 1998. Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res.* 804: 177-192.
- Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., Rall, S.C. Jr, et Mahley, R.W. 1987. Functionnal domains of apolipoprotein B. *Acta Med. Scand. Suppl.* 715: 51-59.
- Iwabuchi, K., Handa, K., et Hakomori, S. 1998. Separation of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J. Biol. Chem.* 273: 33766-33773.
- Janus, E.D., Nicoll, A., Nooten, R., Turner, P.R., Magill, P.J., et Lewis, L. 1980. Quantitative studies of very low density lipoprotein: conversion to low density lipoprotein in normal controls and primary hyperlipidaemic states and the role of direct secretion of low density lipoprotein in heterozygous hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 10, 149-159.
- Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M.L., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Swaney, J.B., et Tall, A.R. 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272: 20982-20985.
- Ji, Z.S., Lauer, S.J., Fazio, S., Bensadoun, A., Taylor, J.M., et Mahley, R.W. 1994. Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipase-secreting hepatoma cells in culture. *J. Biol. Chem.* 269: 13429-13436.
- Jian, B., de la Llera-Moya, M., Ji, Y., Wang, N., Phillips, M.C., Swaney, J.B., Tall, A.R., et Rothblat, G.H. 1998. Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J. Biol. Chem.* 273: 5599-5606.
- Johnson, M.S., Johansson, J.M., Svensson, P.A., Aberg, M.A., Eriksson, P.S., Carlsson, L.M., et Carlsson, B. 2003. Interaction of scavenger receptor class B type I with peroxisomal targeting receptor Pex5p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312: 1325-1334.
- Johnson, M.S., Svensson, P.A., Helou, K., Billig, H., Levan, G., Carlsson, L.M., et Carlsson, B. 1998. Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class



- B type I, a high density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence. *Endocrinology* 139: 72-80.
- Johnson, W.J., Malhbergh, F.H., Rothblat, G.H., et Phillips, M.C. 1991. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1085:273-298.
- Kannel, W.B., Castelli, W.P., et Gordon, T. 1979. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann. Intern. Med.* 90: 85-91.
- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldan, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., et Edwards, P.A. 2005. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 1: 121-131.
- Kinnumen, P.K.J., et Ehnholm, C. 1976. Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett.* 65: 354-357.
- Klein, I., Sarkadi, B., et Varadi, A. 1999. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 237-262.
- Klucken, J., Buchler, C., Orso, E., Kaminski, W.E., Porsch-Ozcurumez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R., et Schmitz, G. 2000. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 817-822.
- Knowles, J.W., Reddick, R.L., Jennette, J.C., Shesely, E.G., Smithies, O., et Maeda, N. 2000. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)ApoE(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J. Clin. Invest.* 105: 451-458.
- Koga, A., Oka, N., Kikuchi, T., Miyazaki, H., Kato, S., et Imaizumi, T. 2003. Adenovirus-mediated overexpression of caveolin-3 inhibits rat cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 42: 213-219.
- Kogo, H., Aiba, T., et Fujimoto, T. 2004. Cell type-specific occurrence of caveolin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  in the lung caused by expression of distinct mRNAs. *J. Biol. Chem.* 279: 25574-25581.

- Kogo, H., et Fujimoto, T.. 2000. Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. Identification Of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing. *FEBS Lett.* 465: 119-123.
- Kogo, H., Ishiguro, K., Kuwaki, S., et Fujimoto, T. 2002. Identification of a splice variant of mouse caveolin-2 mRNA encoding an isoform lacking the C-terminal domain. *Arch. Biochem. Biophys.* 401: 108-114.
- Koleske, A.J., Baltimore, D., et Lisanti, M.P. 1995. Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1381-1385.
- Kozarsky, K.F., Donahee, M.H., Glick, J.M., Krieger, M., et Rader, D.J. 2000. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 721-727.
- Kozarsky, K.F., Donahee, M.H., Rigotti, A., Iqbal, S.N., Edelman, E.R., et Krieger, M. 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 387: 414-417.
- Krieger, M. 1999. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* 68:523-558.
- Kuhlencordt, P.J., Gyurko, R., Han, F., Scherrer-Crosbie, M., Aretz, T.H., Hajjar, R., Picard, M.H., et Huang, P.L. 2001. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 104: 448-454.
- Kurzchalia, T.V., Dupree, P., Parton, R.G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M., et Simons, K. 1992. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* 118: 1003-1014.
- Kutchai, H.C. 1993. Cellular membrane and transmembrane transport of solutes and water: In Berne, R.M., Levy, M.N. (Eds), *Physiology*, Mosby Publ. St-Louis MO. pp. 1-26.
- Lafond, J., Charest, M.C., Alain, J.F., Brissette, L., Masse, A., Robidoux, J., et Simoneau, L. 1999. Presence of CLA-1 and HDL binding sites on syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes of human placenta. *Placenta* 20: 583-590.

- Lamarche, B., Tchernof, A., Mauriège, P., Cantin, B., Dagenais, G.R., Lupien, P.J., et Després, J.P. 1998. Fasting insulin and apolipoprotein B levels and low-density lipoprotein particle size as risk factors for ischemic heart disease. *JAMA* 279: 1955-1961.
- Lamarche, B., Tchernof, A., Moorjani, S., Cantin, B., Dagenais, G.R., Lupien, P.J., et Després, J.P. 1997. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Québec Cardiovascular Study. *Circulation* 95: 69-75.
- Lambert, G., Chase, M.B., Dugi, K., Bensadoun, A., Brewer Jr., H.B., et Santamarina-Fojo, S. 1999. Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor BI. *J. Lipid Res.* 40: 1294-1303.
- Landschulz, K.T., Pathak, R.K., Rigotti, A., Krieger, M., et Hobbs, H.H. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* 98: 984-995.
- Langer, T., Strober, W., et Levy, R. I. 1972. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* 51: 1528-1536.
- Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M.F., Chimini, G., Kaminski, W.E., et Schmitz, G. 1999. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 29-33.
- Lawn, R.M., Wade, D.P., Garvin, M.R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J.G., Seilhamer, J.J., Vaughan, A.M., et Oram, J.F. 1999. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Invest.* 104: R25-R31.
- Lee, K., Godeau, B., Fromont, P., Plonquet, A., Debili, N., Bachir, D., Reviron, D., Gourin, J., Fernandez, E., Galacteros, F., et Bierling, P. 1999. CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. *Transfusion* 39: 873-879.
- Lee, S.W., Reimer, C.L., Oh, P., Campbell, D.B., et Schnitzer, J.E. 1998. Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 16: 1391-1397.

- Leitersdorf, E., Israeli, A., Stein, O., Eisenberg, S., et Stein, Y. The role of apolipoproteins of HDL in the selective uptake of cholesteryl linoleyl ether by cultured rat and bovine adrenal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 878: 320-329.
- Lewis, G.F., et Rader, D.J. 2005. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* 96: 1221-1232.
- Li, S., Couet, J., et Lisanti, M.P. 1996. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271: 29182-29190.
- Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casamova, J.E., Hansen, S.H., Nishimoto, I., et Lisanti, M.P. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* 270: 15693-15701.
- Li, S.W., Seitz, R., et Lisanti, M.P. 1996. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J. Biol.Chem.* 271: 3863–3868.
- Li, W.P., Liu, P., Pilcher, B.K., et Anderson, R.G. 2001. Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J. Cell Sci.* 114: 1397-1408.
- Li, X.A., Titlow, W.B., Jackson, B.A., Giltiy, N., Nikolova-Karakashian, M., Uittenbogaard, A., et Smart, E.J. 2002. High density lipoprotein binding to scavenger receptor, Class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 277: 11058-11063.
- Lipardi, C., Mora, R., Colomer, V., Palasino, S., Nitsch, L., Rodriguez-Boulan, E., et Zurzolo, C. 1998. Caveolin transfection results in caveolae formation but not apical sorting of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 140: 617-626.
- Lipsky, R.H., Sobiesky, D.A., Tandon, N.N., Herman, J., Ikeda, H., et Jamieson, G.A. 1991. Detection of GPIV (CD36) mRNA in Naka- platelets. *Thromb. Haemost.* 65: 456-457.
- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Tang, Z.L., Kubler, E., Koleske, A.J., et Sargiacomo, M.S. Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation. *Mol. Membr. Biol.* 12: 121-124.

- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugirene, J., Tang, Z., Hemanowski-Vosatka, A., Tu, Y.H., Cook, R.F., et Sargiacomo, M. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell Biol.* 126: 111-126.
- Liu, J., Oh, P., Horner, T., Rogers, R.A., Schnitzer, J.E. 1997A. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J. Biol. Chem.* 272: 7211-7222.
- Liu, J., Voutilainen, R., Heikkila, P., et Kahri, A. 1997B. Ribonucleic acid expression of the CLA-I gene, a human homolog to mouse high density lipoprotein receptor SR-BI, in human adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 2522-2527.
- Lougheed, M., et Steinbrecher, U.P. 1996. Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J. Biol. Chem.* 271: 11798-11805.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., et Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luciani, M.F., Denizot, F., Savary, S., Mattei, M.G., et Chimini, G. 1994. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* 21: 150-159.
- Mackinnon, M., Savage, J., Wishart, R., et Barter, P. 1986. Metabolism of the high density lipoprotein in the perfused rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 261:2548-2552.
- Maeno, Y., Fujioka, H., Hollingdale, M.R., Ockenhouse, C.F., Nakazawa, S., et Aikawa, M. 1994. Ultrastructural localization of CD36 in human hepatic sinusoidal lining cells, hepatocytes, human hepatoma (HepG2-A16) cells, and C32 amelanotic melanoma cells. *Exp. Parasitol.* 79: 383-390.
- Malerod, L., Juvet, K., Gjoen, T., et Berg, T. 2002. The expression of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and caveolin-1 in parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Cell Tissue Res.* 307: 173-180.
- Marcil, M., Boucher, B., Krimbou, B.C., Solymos, J., Davignon, J., Frohlich, J. et Genest, J. Jr. 1995. Severe familial HDL deficiency in French-Canadian kindreds. Clinical, biochemical, and molecular characterization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1015-1024.

- Marcil, M., Brooks-Wilson, A., Clee, S.M., Roomp, K., Zhang, L.H., Yu, L., Collins, J.A., van Dam, M., Molhuizen, H.O., Loubster, O., Ouellette, B.F., Sensen, C.W., Fichter, K., Mott, S., Denis, M., Boucher, B., Pimstone, S., Genest, J. Jr, Kastelein, J.J., et Hayden, M.R. 1999a. Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* 354: 1341-1346.
- Marcil, M., Yu, L., Krimbou, L., Boucher, B., Oram, J.F., Cohn, J.S., et Genest, J. Jr. 1999b. Cellular cholesterol transport and efflux in fibroblasts are abnormal in subjects with familial HDL deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 159-169.
- Mastick, C.C., Brady, M.J., et Saltiel, A.R. 1995. Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J. Cell Biol.* 129: 1523-1531.
- Matveev, S., Uittenbogaard, A., van der Westhuyzen, D.R., et Smart, E. J. (2001). Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester. *Eur. J. Biochem.* 268: 5609-5616.
- Matveev, S., van der Westhuyzen, D.R. et Smart, E.R. 1999. Co-expression of scavenger associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages. *J. Lipid Res.* 40: 1647-1654.
- Matveev, S., Van Der Westhuyzen, D.R., et Smart, E.J. 1999. Co-expression of scavenger receptor-BI and caveolin-1 is associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages. *J. Lipid Res.* 40: 1647-1654.
- McFarlane, A.S. 1958. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 182: 53-54.
- Mendez, A.J., Lin, G., Wade, D.P., Lawn, R.M., et Oram, J.F. 2001. Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 3158-3166.
- Mineo, C., et Shaul, P.W. 2003. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc. Med.* 13: 226-231.
- Mineo, C., Ying, Y.S., Chapline, C., Jaken, S., et Anderson, R.G. 1998. Targeting of protein kinase Calpha to caveolae. *J. Cell Biol.* 141: 601-610.
- Monier, S., Parton, R.G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., Kurzchalia, T.V. 1995. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* 6: 911-927.

- Moorjani, S., Roy, M., Gagné, C., Davignon, J., Brun, D., Toussaint, M., Lambert, M., Campeau, L., Blauchman, S., et Lupien, P. 1989. Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Québec Province. *Arteriosclerosis* 9: 211-216.
- Mora, R., Bonilha, V.L., Marmostein, A., Scherer, P.E., Brown, D., Lisanti, M.P., et Rodriguez-Boulan, E. 1999. Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 274: 25708-25717.
- Morrison, J., Fidge, N.H., et Tozuka, M. 1991. Determination of the structural domain of ApoAI recognized by high density lipoprotein receptors. *J. Biol. Chem.* 266:18780-18785.
- Mulcahy, J.V., Riddell, D.R., et Owen, J.S. 2004. Human scavenger receptor class B type II (SR-BII) and cellular cholesterol efflux. *Biochem. J.* 377: 741-747.
- Muller, G., et Geisen, K. 1996. Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at adipocytes. *Horm. Metab.Res.* 28: 469-487.
- Müller, H., Deckers, K., et Eckel, J. 2002. The fatty acid translocase (FAT)/CD36 and the glucose transporter GLUT4 are localized in different cellular compartments in rat cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 665-669.
- Murao, K., Terpstra, V., Green, S.R., Kondratenko, N., Steinberg, D., et Quehenberger, O. 1997. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor B1, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J. Biol. Chem.*, 272: 17551-17557.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., et Simons, K. 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10339-10343.
- Nagelkerke, J.F., Barto, K.P., et van Berkel, T.J. 1983. In vivo and in vitro uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by rat liver endothelial, Kupffer, and parenchymal cells. *J. Biol. Chem.* 258: 12221-12227.
- Nakata, A., Nakagawa, Y., Nishida, M., Nozaki, S., Miyagawa, J., Nakagawa, T., Tamura, R., Matsumoto, K., Kameda-Takemura, K., Yamashita, S., et Matsuzawa, Y. 1999. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on

- lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 1333-1339.
- Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., Hama, S.Y., Territo, M.C., Lusis, A.J., Shih, D.M., Van Lenten, B.J., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., et Fogelman, A.M. 1996. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 831-842.
- Ness, G.C., Kohlruss, N., et Gertz, K.R. 2003. Association of the low-density lipoprotein receptor with caveolae in hamster and rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 177-181.
- Nikkila, E.A. 1983. *Dans* The metabolic basis of inherited disease. Ed. J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, Fredrickson, D.S. McGraw-Hill, New York. pp: 622-642.
- Oh, P., McIntosh, D.P., et Schnitzer, J.E. 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.* 141: 101-114.
- Ohashi, R., Mu, H., Wang, X., Yao, Q., et Chen, C. 2005. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *Q.J.M.* 98: 845-856.
- Okamoto, C.T. 1998. Endocytosis and transcytosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29:215-228.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Schere, P.E., et Lisanti, M.P. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273: 5419-5422.
- Okumara, T., et Jamieson, G.A. 1976. Platelet glycoprotein. I. Orientation of glycoproteins of the human platelet surface. *J. Biol. Chem.* 251: 5944-5949.
- Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., et Seed, B. 1989. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58: 95-101.
- Oram, J.F. 2003. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 720-727.
- Oram, J.F., Lawn, R.M., Garvin, M.R., et Wade, D.P. 2000. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J. Biol. Chem.* 275: 34508-34511.
- Pagler, T.A., Rhode, S., Neuhofer, A., Laggner, H., Strobl, W., Hinterdorfer, C., Volf, I., Pavelka, M., Eckhardt, E.R., van der Westhuyzen, D.R., Schutz, G.J., et Stangl, H.



2006. SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 281: 11193-11204.
- Palade, G.E. 1953. Fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Physics* 24: 1424.
- Parathath, S., Connelly, M.A., Rieger, R.A., Klein, S.M., Abumrad, N.A., de la Llera-Moya, M., Iden, C.R., Rothblat, G.H., et Williams, D.L. 2004. Changes in plasma membrane properties and phosphatidylcholine subspecies of insect Sf9 cells due to expression of scavenger receptor class B, type I, and CD36. *J. Biol. Chem.* 279: 41310-41318.
- Park, D.S., Cohen, A.W., Frank, P.G., Razani, B., Lee, H., Williams, T.M., Chandra, M., Shirani, J., De Souza, A.P., Tang, B., Jelicks, L.A., Factor, S.M., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., et Lisanti, M.P. 2003. Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span. *Biochemistry* 42: 15124-15131.
- Park, D.S., Lee, H., Riedel, C., Hulit, J., Scherer, P.E., Pestell, R.G., et Lisanti, M.P. 2001. Prolactin negatively regulates caveolin-1 gene expression in the mammary gland during lactation, via a Ras-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 276: 48389-48397.
- Park, D.S., Woodman, S.E., Schubert, W., Cohen, A.W., Frank, P.G., Chandra, M., Shirani, J., Razani, B., Tang, B., Jelicks, L.A., Factor, S.M., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., et Lisanti, M.P. 2002. Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. *Am. J. Pathol.* 160: 2207-2217.
- Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J.A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P.E., Mora, R., Rodriguez-Boulan, E., Peschle, C., et Lisanti, M.P. 1999. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J. Biol. Chem.* 274: 25718-25725.
- Pearse, B.M.F. 1976. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1255-1259.
- Pelsters, M.M., Lutgerink, J.T., Nieuwenhoven, F.A., Tandon, N.N., van der Vusse, G.J., Arends, J.W., Hoogenboom, H.R., et Glatz, J.F. 1999. A sensitive immunoassay for rat fatty acid translocase (CD36) using phage antibodies selected on cell transfectants: abundant presence of fatty acid translocase/CD36 in cardiac and red skeletal muscle and up-regulation in diabetes. *Biochem. J.* 337: 407-414.

- Peng, Y., Akmentin, W., Connelly, M.A., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., et Williams, D.L. 2004. Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol. Biol. Cell.* 15: 384-396.
- Peters, K.R., Carley, W.W., et Palade, G.E. 1985. Endothelial plasmalemmal vesicles have a characteristic striped bipolar surface structure. *J. Cell Biol.* 101: 2233-2238.
- Pike, L.J. 2004. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* 278: 281-292.
- Pittman, R.C., Knetcht, T.P., Rosenbaum, M.S., et Taylor, C.A. 1987. A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters. *J. Biol. Chem.* 262: 2443-2450.
- Pohl, J., Ring, A., Eehalt, R., Schulze-Bergkamen, H., Schad, A., Verkade, P., et Stremmel, W. 2004. Long-chain fatty acid uptake into adipocytes depends on lipid raft function. *Biochemistry* 43: 4179-4187.
- Pohl, J., String, A., et Stremmel, W. 2002. Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *J. Lipid Res.* 43: 1390-1399.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E., et Parton, R.G. 2001. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell Biol.* 152: 1057-1070.
- Pullinger, C.R., Hakamata, H., Duchateau, P.N., Eng, C., Aouizerat, B.E., Cho, M.H., Fielding, C.J., et Kane, J.P. 2000. Analysis of hABCI gene 5' end: additional peptide sequence, promoter region, and four polymorphisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 451-455.
- Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., et Lusis, A.J. 1990. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 344: 254-257.
- Rawn, J.D. 1990. *Biochemistry*. Éditions De Boeck-Wesmael, Belgique. pp. 572-575.
- Rawson, R.B., Cheng, D., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1998. Isolation of cholesterol-requiring mutant Chinese hamster ovary cells with defects in cleavage of sterol regulatory element-binding proteins at site 1. *J. Biol. Chem.* 273: 28261-28269.

- Rawson, R.B., Zelenski, N.G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M.T., Chang, T.-Y., Brown, M.S., Goldstein, J.L. 1997. Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol. Cell* 1: 47-57.
- Razani, B., Combs, T.P., Wang, X.B., Frank, P.G., Park, D.S., Russell, R.G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L.A., Scherer, P.E., et Lisanti, M.P. 2002A. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J. Biol. Chem.* 277: 8635-8647.
- Razani, B., Engelman, J.A., Wang, X.B., Schubert, W., Zhang, X.L., Marks, C.B., Macaluso, F., Russell, R.G., Li, M., Pestell, R.G., Di Vizio, D., Hou, H. Jr, Kneitz, B., Lagaud, G., Christ, G.J., Edelmann, W., et Lisanti, M.P. 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276: 38121-38138.
- Razani, B., Wang, X.B., Engelman, J.A., Battista, M., Lagaud, G., Zhang, X.L., Kneitz, B., Hou, H. Jr, Christ, G.J., Edelmann, W., et Lisanti, M.P. 2002B. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol. Cell Biol.* 22: 2329-2344.
- Razani, B., Woodman, S.E., et Lisanti, M.P. 2002C. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev.* 54: 431-467.
- Reaven, E., Cortez, Y., Leers-Sucheta, S., Nomoto, A., et Azhar, S. 2004. Dimerization of the scavenger receptor class B type I: formation, function, and localization in diverse cells and tissues. *J. Lipid Res.* 45: 513-528.
- Remaley, A.T., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Neufeld, E.B., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Eggerman, T.L., Patterson, A.P., Duverger, N.J., Santamarina-Fojo, S., et Brewer, H.B. Jr. 2001. Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 818-823.
- Ren, Y., Silverstein, R.L., Allen, J., et Savill, J. 1995. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J. Exp. Med.* 181: 1857-1862.
- Rensen, P.C.N., et Van Berkel T.J.C. 1996. Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 271:14791-14799.

- Repetto, S., Bado, M., Broda, P., Lucania, G., Masetti, E., Sotgia, F., Carbone, I., Pavan, A., Bonilla, E., Cordone, G., Lisanti, M.P., et Minetti, C. 1999. Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 547-550.
- Rhainds, D., Bourgeois, P., Bourret, G., Huard, K., Falstraalt, L., et Brissette, L. 2004. Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J. Cell Sci.* 117: 3095-3105.
- Rhainds, D., Brodeur, M., Lapointe, J., Charpentier, D., Falstraalt, L., et Brissette, L. 2003. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry* 42: 7527-7538.
- Rhainds, D., et Brissette, L. 1999. Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 915-931.
- Rhainds, D., Falstraalt, L., Tremblay, C., et Brissette, L. 1999. Uptake and fate of class B scavenger receptor ligands in HepG2 cells. *Eur. J. Biochem.* 261: 227-235.
- Rigotti, A., Acton, S.L., et Krieger, M. 1995. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J. Biol. Chem.* 270:16221-16224.
- Rigotti, A., Trigatti, B.L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., et Krieger, M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12610-12615.
- Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P., et Stremmel, W. 2006. Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 416-423.
- Rinninger, F., Brundert, M., Jackle, S., Galle, P.R., Busch, C., Izbocki, J.R., Rogiers, X., Henne-Burns, D., Kremer, B., et Broelsch, C.E. 1994. Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human hepatocytes in primary cultures. *Hepatology* 19: 1100-1114.
- Rinninger, F., et Greten, H. 1990. High-density lipoprotein particle uptake and selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters by J774 macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1043: 318-326.

- Rinninger, F., et Pittman, R.C. 1988. Regulation of the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human fibroblasts and HepG2 hepatoma cells. *J. Lipid Res.* 29: 1179-1193.
- Roberts, D. C., Miller, N. E., Price, S. G., Crook, D., Cortese, C., La Ville, A., Masana, L., et Lewis, B. 1985. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro. *Biochem. J.* 226: 319-322.
- Rogler, G., Trumbach, B., Klima, B., Lackner, K.J., et Schmitz, G. 1995. HDL-mediated efflux of intracellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 683-690.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., et Anderson, R.G. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673-682.
- Rothberg, K.G., Ying, Y.S., Kamen, B.A., et Anderson, R.G. 1990. Cholesterol controls the clustering of the glycosphospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell Biol.* 111: 2931-2938.
- Rothblat, G.H., de la Llera-Moya, M., Atger, V., Kellner-Weibel, G., Williams, D.L., et Phillips, M.C. 1999. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J. Lipid Res.* 40: 781-796.
- Rubic, T., et Lorenz, R.L. 2006. Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10. *Cardiovasc. Res.* 69: 527-535.
- Russell, D.W., Yamamoto, T., Schneider, W.J., Slaughter, C.J., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1983. cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: feedback regulation of a receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7501-7505.
- Rust, S., Walter, M., Funke, H., von Eckardstein, A., Cullen, P., Kroes, H.Y., Hordijk, R., Geisel, J., Kastelein, J., Molhuizen, H.O., Schreiner, M., Mischke, A., Hahmann, H.W., et Assmann, G. 1998. Assignment of Tangier disease to chromosome 9q31 by a graphical linkage exclusion strategy. *Nat. Genet.* 20: 96-98.
- Sahoo, D., Darlington, Y.F., Pop, D., Williams, D.L., et Connelly, M.A. 2007. Scavenger receptor class B Type I (SR-BI) assembles into detergent-sensitive dimers and tetramers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1771:807-817.

- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1998. Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J. Biol. Chem.* 273: 5785-5793.
- Santamarina-Fojo, S., Peterson, K., Knapper, C., Qiu, Y., Freeman, L., Cheng, J.F., Osorio, J., Remaley, A., Yang, X.P., Haudenschild, C., Prades, C., Chimini, G., Blackmon, E., Francois, T., Duverger, N., Rubin, E.M., Rosier, M., Deneffe, P., Fredrickson, D.S., et Brewer, H.B. Jr. 2000. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7987-7992.
- Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K.S., Sanders, M.C., et Lisanti, M.P. 1995. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9407-9411.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z., et Lisanti, M.P. 1993. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 122: 789-807.
- Sato, O., Kuriki, C., Fukui, Y., et Motojima, K. 2002. Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. *J. Biol. Chem.* 277: 15703-15711.
- Scanu, A.M. 1986. *Dans* Biochemistry and biology of plasma lipoproteins. Ed. A.M. Scanu et A.A. Spector. Marcel Dekker, New York. pp.1-10.
- Schaeffer E.J., Eisenberg, S. et Levy, R.I. 1978. Lipoprotein apoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* 19: 667-687.
- Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D.S., Van Donselaar, E., Peters, P., et Lisanti, M.P. 1997. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* 272: 29337-29346.
- Scherer, P.E., Lisanti, M.P., Baldini, G., Sargiacomo, M., Mastick, C.C., et Lodish, H.F. 1994. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J. Cell Biol.* 127: 1233-1243.

- Scherer, P.E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H.F., et Lisanti, M.P. 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 131-135.
- Scherer, P.E., Tang, Z., Chun, M., Sargiacomo, M., Lodish, H.F., et Lisanti, M.P. 1995. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* 270: 16395-16401.
- Schmitz, G., Langmann, T., et Heimerl, S. 2001. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 42: 1513-1520.
- Schnitzer, J.E., Liu, J., et Oh, P. 1995. Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J. Biol. Chem.* 270: 14399-14404.
- Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E., et Allard, J. 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* 127: 1217-1232.
- Schubert, W., Frank, P.G., Razani, B., Park, D.S., Chow, C.W., et Lisanti, M.P. 2001. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J. Biol. Chem.* 276: 48619-48622.
- Sehayek, E., Ono, J.G., Sheffer, S., Nguyen, L.B., Wang, N., Batta, A.K., Salen, G., Smith, J.D., Tall, A.R., et Breslow, J.L. 1998. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10194-10199.
- Shaul, P.W. 2002. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 749-774.
- Shaul, P.W. 2003. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J. Physiol.* 547: 21-33.
- Sigurdsson, G., Nicoll, A. et Lewis, B. 1975. Conversion of very low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 56: 1481-1490.
- Silver, D.L. 2002. A carboxyl-terminal PDZ-interacting domain of scavenger receptor B, type I is essential for cell surface expression in liver. *J. Biol. Chem.* 277: 34042-34047.



- Silverstein, R.L., et Nachman, R.L. 1987. Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion. *J. Clin. Invest.* 79: 867-874.
- Smart, E.J., Ying, Y.S., Conrad, P.A., et Anderson, R.G. 1994. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell Biol.* 127: 1185-1197.
- Smart, E.J., Ying, Y.S., Donzell, W.C., et Anderson, R.G. 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 271: 29427-29435.
- Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C., et Anderson, R.G. 1995. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10104-10108.
- Song, K.S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L.A., Sargiacomo, M., et Lisanti, M.P. 1996A. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* 271: 9690-9697.
- Song, K.S., Scherer, P.E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D.S., et Lisanti, M.P. 1996B. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 271: 15160-15165.
- Soutar, A.K., Garner, C.W., Baker, H.N., Sparrow, J.T., Jackson, R.L. Gotto, A.M., et Smith, L.C. 1975. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 14: 3057-3064.
- Souto, R.P., Vallega, G., Wharton, J., Vinten, J., Trandum-Jensen, J., Pilch, P.F. 2003. Immunopurification and characterization of rat adipocyte caveolae suggest their dissociation from insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 278: 18321-18329.
- Sowa, G., Pypaert, M., Fulton, D., et Sessa, W.C. 2003. The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6511-6516.



- Ståhlberg, N., Rico-Bautista, E., Fisher, R.M., Wu, X., Cheung, L., Flores-Morales, A., Tybring, G., Norstedt, G., et Tollet-Egnell, P. 2004. Female-predominant expression of fatty acid translocase/CD36 in rat and human liver. *Endocrinology* 145:1972-1979.
- Stampfer, M.J., Krauss, R.M., Ma, J., Blanche, P.J., Holl, L.G., Sacks, F.M., et Hennekens, C.H. 1996. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *JAMA* 276: 882-888.
- Stangl, H., Cao, G., Wyne, K.L., et Hobbs, H.H. 1998. Scavenger receptor, class B, type I-dependent stimulation of cholesterol esterification by high density lipoproteins, low density lipoproteins, and nonlipoprotein cholesterol. *J. Bio. Chem.* 273: 31002-31008.
- Steinberg, D. 1983. Lipoproteins and atherosclerosis. A look back and look ahead. *Arteriosclerosis* 3: 283-301.
- Steinberg, D. 1997A. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95: 1062-1071.
- Steinberg, D. 1997B. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272: 20963-20966.
- Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., et Steinberg, D. 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3883-3887.
- Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., et Steinberg, D. 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3883-3887.
- Sudhof, T.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., et Russell, D.W. 1985. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228: 815-822.
- Superko, H.R. 1996. What can we learn about dense low density lipoprotein and lipoprotein particles from clinical trials? *Curr. Opin. Lipidol.* 7: 363-368.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Kodama, T., Horiuchi, S., Takahashi, K.

- KYUIJT, J.K., Van Berkel, T.J., Steinbrecher, U.P., Ishibashi, S., Maeda, N., Gordon, S., et Kodama, T. 1997. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386: 292-296.
- Sviridov, D., et Fidge, N. 1995. Efflux of intracellular versus plasma membrane cholesterol in HepG2 cells: different availability and regulation by apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* 36: 1887-1896.
- Swarnakar, S., Reyland, M.E., Deng, J., Azhar, S., et Williams, D.L. 1998. Selective uptake of low density lipoprotein-cholesteryl ester is enhanced by inducible apolipoprotein E expression in cultured mouse adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* 273: 12140–12147.
- Swarnakar, S., Temel, R.E., Connelly, M.A., Azhar, S., et Williams, D.L. 1999. Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J. Biol. Chem.* 274: 29733–29739.
- Tanaka, A.R., Ikeda, Y., Abe-Dohmae, S., Arakawa, R., Sadanami, K., Kidera, A., Nakagawa, S., Nagase, T., Aoki, R., Kioka, N., Amachi, T., Yokoyama, S., et Ueda, K.. 2001. Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homologous to an epitope of Sjogren's Syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 1019-1025.
- Tandon, N.N., Kralisz, U., et Jamieson, G.A. 1989. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J. Biol. Chem.* 264: 7576-7583.
- Tang, C.K., Yi, G.H., Yang, J.H., Liu, L.S., Wang, Z., Ruan, C.G., et Yang, Y.Z. 2004. Oxidized LDL upregulated ATP binding cassette transporter-1 in THP-1 macrophages. *Acta Pharmacol. Sin.* 25: 581-586.
- Tang, Z., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D.S., Nishimoto, I., Lodish, H.F., et Lisanti, M.P. 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 271: 2255-2261.
- Tang, Z.L., Scherer, P.E., et Lisanti, M.P. 1994. The primary sequence of murine caveolin reveals a conserved consensus site for phosphorylation by protein kinase C. *Gene* 147: 299-300.
- Temel, R.E., Trigatti, B.L., DeMattos, R.B., Azhar, S., Krieger, M., et Williams, D.L. 1997. Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high

- density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94: 13600–13605.
- Thomson, A.B.R., et Shaffer, E.A. 2000. *First principles of gastroenterology: the basis of disease and an approach to management*. 3<sup>e</sup> édition. Canada. Chapitre 14.
- Thuahnai, S.T., Lund-Katz, S., Anantharamaiah, G.M., Williams, D.L., et Phillips, M.C. 2003. A quantitative analysis of apolipoprotein binding to SR-BI: multiple binding sites for lipid-free and lipid-associated apolipoproteins. *J. Lipid Res.* 44: 1132-1142.
- Thuahnai, S.T., Lund-Katz, S., Dhanasekaran, P., de la Llera-Moya, M., Connelly, M.A., Williams, D.L., Rothblat, G.H., et Phillips, M.C. 2004. Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure. *J. Biol. Chem.* 279: 12448-12455.
- Thuahnai, S.T., Lund-Katz, S., Williams, D.L., et Phillips, M.C. 2001. Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *J. Biol. Chem.* 276: 43801–43808.
- Tirupathi, C., Song, W., Bergenfeldt, M., Sass, P., et Malik, A.B. 1997. Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 272: 25968-25975.
- Tortora, G.J., et Grabowski, S.R. 1993. *Principles of anatomy and physiology*. 7<sup>e</sup> édition. Biological sciences textbooks, Inc. New York. pp: 648-650.
- Trigatti, B., Rayburn, H., Vinals, M., Braun, A., Miettinen, H., Penman, M., Hertz, M., Schrenzel, M., Amigo, L., Rigotti, A., et Krieger, M. 1999A. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9322-9327.
- Trigatti, B.L., Anderson, R.G.W., et Gerber, G.E. 1999B. Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 255: 34-39.
- Truong, T.Q., Aubin, D., Bourgeois, P., Falstrault, L., et Brissette, L. 2006. Opposite effect of caveolin-1 in the metabolism of high-density and low-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1761:24-36.

- Truong, T.Q., Auger, A., DenizEAU, F., et Brissette, L. 2000. Analysis of low-density lipoprotein catabolism by primary cultures of hepatic cells from normal and low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1484:307-315.
- Tsuruoka, H., Khovidhunkit, W., Brown, B.E., Fluhr, J.W., Elias, P.M., et Feingold, K.R. 2002. Scavenger receptor class B type I is expressed in cultured keratinocytes and epidermis. Regulation in response to changes in cholesterol homeostasis and barrier requirements. *J. Biol. Chem.* 277: 2916-2922.
- Uehara, K, et Miyoshi, M. 2002. Localization of caveolin-3 in the sinus endothelial cells of the rat spleen. *Cell Tissue Res.* 307: 329-336.
- Uittenbogaard, A., et Smart, E.J. 2000. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J. Biol. Chem.* 275: 25595-25599.
- Uittenbogaard, A., Everson, W.V., Matveev, S.V., et Smart, E.J. 2002. Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex. *J. Biol. Chem.* 277: 4925-4931.
- Uittenbogaard, A., Shaul, P.W., Yuhanna, I.S., Blair, A., et Smart, E.J. 2000. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J. Biol. Chem.* 275: 11278-11283.
- Uittenbogaard, A., Ying, Y., et Smart, E.J. 1998. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem.* 273: 6525-6532.
- Urban, S., Zieseniss, S., Werder, M., Hauser, H., Budzinski, R., et Engelmann, B. 2000. Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into the cells. *J. Biol. Chem.* 275: 33409-33415.
- Vadiveloo, P.K., Allan, C.M., Murray, B.J., et Fidge, N.H. 1993. Interaction of apolipoprotein AII with the putative high-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* 32: 9480-9485.
- van Berkel, T.J., De Rijke, Y.B., et Kruijt, J.K. 1991. Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats.

- Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. *J. Biol. Chem.* 266: 2282-2289.
- van Dam, M.J., de Groot, E., Clee, S.M., Hovingh, G.K., Roelants, R., Brooks-Wilson, A., Zwinderman, A.H., Smit, A.J., Smelt, A.H., Groen, A.K., Hayden, M.R., et Kastelein, J.J. 2002. Association between increased arterial-wall thickness and impairment in ABCA1-driven cholesterol efflux: an observational study. *Lancet* 359: 37-42.
- van Nieuwenhovenm, F.A., Verstijnen, C.P., Abumrad, N.A., Willemsen, P.H., Van Eys, G.J., Van der Vusse, G.J., et Glatz, J.F. 1995. Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207:747-752.
- Varban, M.L., Rinninger, F., Wang, N., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Gosselin, M.L., Dixon, K.L., Deeds, J.D., Acton, S.L., Tall, A.R., et Huszar, D. 1998. Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4619-4624.
- Varban, M.L., Rinninger, F., Wang, N., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Gosselin, M.L., Dixon, K.L., Deeds, J.D., Acton, S.L., Tall, A.R., et Huszar, D.(199). Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 4619-4624.
- Vepa, S., Scribner, W.M., et Natarajan, V. 1997. Activation of protein phosphorylation by oxidants in vascular endothelial cells: identification of tyrosine phosphorylation of caveolin. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 25-35.
- Vogel, U., Sandvig, K., et Van Deurs, B. 1998. Expression of caveolin-1 and polarized formation of invaginated caveolae in Caco-2 and MDCK II cells. *J. Cell Sci.* 111: 825-832.
- Volonte, D., Galbiati, F., Pestell, R.G., et Lisanti, M.P. 2001. Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 276: 8094-8103.

- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., et Gay, N.J. 1982. Distantly related sequences in the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 8: 945-951.
- Wang, J., Burnett, J.R., Near, S., Young, K., Zinman, B., Hanley, A.J., Connelly, P.W., Harris, S.B., et Hegele, R.A. 2000. Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1983-1989.
- Wang, L., Connelly, M.A., Ostermeyer, A.G., Chen, H.H., Williams, D.L., et Brown, D.A. 2003. Caveolin-1 does not affect SR-BI-mediated cholesterol efflux or selective uptake of cholesteryl ester in two cell lines. *J. Lipid Res.* 44: 807-815.
- Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F., et Tall, A.R. 1998. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 273: 32920-32926.
- Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F., et Tall, A.R. 1998. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 273: 32920–32926.
- Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., et Tall, A.R. 2004. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9774-9779.
- Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F., et Tall, A.R. 2006. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 1310-1316.
- Wang, N., Silver, D.L., Thiele, C., et Tall, A.R. 2001. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 276: 23742-23747.
- Way, M., et Parton, R.G. 1995. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* 376: 108-112.
- Webb, N.R., Connell, P.M., Graf, G.A., Smart, E.J., De Villiers, W.J., De Beer, F.C., et Van Der Westhuyzen, D.R. 1998. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI

- containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J. Biol. Chem.* 273: 15241-15248.
- Webb, N.R., de Villiers, W.J., Connell, P.M., de Beer, F.C., et van der Westhuyzen, D.R. 1997. Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J. Lipid Res.* 38, 1490–1495.
- Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1990. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 265: 22453-22459.
- Welch, C.L., Xia, Y.R., Gu, L.J., Machleder, D., Mehrabian, M., Wen, P.Z., Webb, N., de Villiers, W.J., van der Westhuyzen, D.R., et Lusis, A.J. 1997. *Srbl* maps to mouse chromosome 5 in a region harboring putative QTLs for plasma lipoprotein levels. *Mammalian Genome* 8: 942–944.
- Werder, M., Han, C.H., Wehrli, E., Bimmler, D., Schulthess, G., et Hauser, H. 2001. Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochemistry* 40: 11643–11650.
- Wishart, R, et Mackinnon, M. 1990. Uptake and metabolism of high-density lipoproteins by cultured rabbit hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1044: 375-381.
- Woodman, S.E., Cheung, M.W., Tarr, M., North, A.C., Schubert, W., Lagaud, G., Marks, C.B., Russell, R.G., Hassan, G.S., Factor, S.M., Christ, G.J., et Lisanti, M.P. 2004. Urogenital alterations in aged male caveolin-1 knockout mice. *J. Urol.* 171: 950-957.
- Woodman, S.E., Park, D.S., Cohen, A.W., Cheung, M.W., Chandra, M., Shirani, J., Tang, B., Jelicks, L.A., Kitsis, R.N., Christ, G.J., Factor, S.M., Tanowitz, H.B., et Lisanti, M.P. 2002. Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J. Biol. Chem.* 277: 38988-38997.
- Xu, S., Laccotripe, M., Huang, X., Rigotti, A., Zannis, V.I., et Krieger, M. 1997. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *J Lipid Res.* 38: 1289-1298.
- Yamada, E. 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 445-458.

- Yamamoto, N., Ikeda, H., Tandon, N.N., Heman, J., Tomiyama, Y., Mitani, T., Sekiguchi, S., Lipsky, R., Kralisz, U., et Jamieson, G.A. 1990 A platelet membrane glycoprotein (GP) deficiency in healthy blood donors: Naka- platelets lack detectable GPIV (CD36). *Blood* 76: 1698-1703.
- Yamamoto, T., Davis, C.G., Brown, M.S., Schneider, W.J., Casey, M.L., Goldstein, J.L., et Russell, D.W. 1984. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39: 27-38.
- Yanai, H., Chiba, H., Morimoto, M., Abe, K., Fujiwara, H., Fuda, H., Hui, S.P., Takahashi, Y., Akita, H., Jamieson, G.A., Kobayashi, K., et Matsuno, K. 2000. Human CD36 deficiency is associated with elevation in low-density lipoprotein-cholesterol. *Am. J. Med. Genet.* 93: 299-304.
- Yancey, P.G., Rodriguez, W.V., Kilsdonk, E.P.C., Stoudt, G.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., et Rothblat, G.H. 1996. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins: demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* 271: 16026-16034.
- Yeh, Y.C., Hwang, G.Y., Liu, I.P., et Yang, V.C. 2002. Identification and expression of scavenger receptor SR-BI in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 161: 95-103.
- Yokomori H., Oda, M., Ogi, M., Sakai, K., et Ishii, H. 2002. Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis. *Liver* 22: 150-158.
- Yokomori, H., Oda, M., Yoshimura, K., Nomura, M., Wakabayashi, G., Kitajima, M., et Ishii, H. 2003. Elevated expression of caveolin-1 at protein and mRNA level in human cirrhotic liver: relation with nitric oxide. *J. Gastroenterol.* 38: 854-860.
- Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1993. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75: 187-197.
- Yoshida, H., Quehenberger, O., Kondratenko, N., Green, S., et Steinberg, D. 1998. Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrophage scavenger receptors in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 794-802.



- Yoshimura, A., Yoshida, T., Seguchi, T., Waki, M., Ono, M., et Kuwano, M. 1987. Low binding capacity and altered O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptor in a monensin-resistant mutant of Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 262: 13299-13308.
- Yuhanna, I.S., Zhu, Y., Cox, B.E., Hahner, L.D., Osborne-Lawrence, S., Lu, P., Marcel, Y.L., Anderson, R.G., Mendelsohn, M.E., Hobbs, H.H., et Shaul, P.W. 2001. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 7: 853-857.
- Zakim, D., et Boyer, T.D., 1990. Dans: *Hepatology*. W. Saunders Company, London.
- Zeng, Y., Tao, N., Chung, K.N., Heuser, J.E., et Lublin, D.M. 2003. Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 278: 45931-45936.
- Zhang, X., Fitzsimmons, R.L., Cleland, L.G., Ey, P.L., Zannettino, A.C., Farmer, E.A., Sincock, P., et Mayrhofer, G. 2003. CD36/fatty acid translocase in rats: distribution, isolation from hepatocytes, and comparison with the scavenger receptor SR-B1. *Lab Invest.* 83:317-332.
- Zhao, Y., Sparks, D.L., et Marcel, Y.L. 1996. Effect of the apolipoprotein A-I and surface lipid composition of reconstituted discoidal HDL on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. *Biochemistry* 35: 16510-16518.
- Zheng, P., Horwitz, A., Waelde, C.A., et Smith, J.D. 2001. Stably transfected ABCA1 antisense cell line has decreased ABCA1 mRNA and cAMP-induced cholesterol efflux to apolipoprotein AI and HDL. *Biochim. Biophys. Acta* 1534: 121-128.
- Zingg, J.M., Ricciarelli, R., Andorno, E., et Azzi, A. 2002. Novel 5' exon of scavenger receptor CD36 is expressed in cultured human vascular smooth muscle cells and atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 412-417.