

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INFLUENCE DES MÉCANISMES D'ENDOCYTOSE ET DE LA LOCALISATION  
MEMBRANAIRE DU RECEPTEUR *SCAVENGER* DE CLASSE B, TYPE I SUR LA  
CAPTATION SÉLECTIVE DES ESTERS DE CHOLESTÉROL DES LIPOPROTÉINES  
DE FAIBLE (LDL) ET DE HAUTE (HDL) DENSITÉ

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXGIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
FÉLIX-LABONTÉ TREMBLAY

JUIN 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire 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.»

## REMERCIEMENTS

Ce projet ambitieux d'étudier la captation sélective sous un nouvel angle est le fruit de plusieurs précieuses rencontres. Rencontre d'abord, en 2005, avec la biochimie et la biologie cellulaire grâce à laquelle j'ai pu découvrir le plaisir d'étudier ce qui constitue — j'emprunterai sans gêne la formule consacrée — l'unité de base de la vie: la cellule. Plaisir difficile au départ, il faut bien l'avouer, mais plaisir quand même puisque bien vite je me surpris à écrire à Louise Brissette, qui m'enseignait alors et deviendrait en 2007 ma directrice de maîtrise: «l'activité des récepteurs de lipoprotéines fait partie de ces choses qui semblent pénétrer avec une grande facilité mon cortex, sans résistance aucune de mon hippocampe». J'espérais qu'elle verrait dans ces mots un témoignage de mon intérêt, mais il s'agissait en fait d'une maladroite flatterie destinée à souligner le respect qu'elle m'inspirait. Ce sentiment de profond respect à son égard ne m'a toujours pas quitté et cette rencontre est certainement beaucoup plus importante que la première. Autre rencontre qu'il ne faut pas passer sous silence, celle de David Rhinds, mon co-directeur, à propos de qui j'ai dit qu'il n'avait qu'un seul défaut: celui de connaître toutes ses qualités. Grâce à lui, j'ai pris plaisir à être rigoureux. J'ai aussi trouvé quelqu'un avec qui parler de tout et dont les bons mots m'ont été très chers. À eux-deux, ils ont su rendre ces deux dernières années et demie fructueuses, enrichissantes, mais surtout très agréables. Je les remercie donc profondément.

Je tiens aussi à souligner l'aide que m'a apporté Louise Martin-Falstrault avec qui j'ai partagé la plupart de mon temps au laboratoire. Sans elle, j'aurais certainement fini par m'ennuyer et probablement brisé ou fait exploser quelque chose. Peut-être n'avons-nous pas encore réalisé «l'expérience du siècle», mais ça ne sera pas faute d'avoir essayé et je sais qu'elle sera d'accord avec moi si j'affirme que le siècle est encore jeune.

Je remercie aussi tous ceux que j'ai croisés au laboratoire, étudiants et stagiaires, et qui, à mon grand malheur, ont trop rapidement quitté. Plus particulièrement Veneta Krasteva avec qui j'ai fait mon stage à l'été 2006 et qui m'a beaucoup appris ainsi que Mathieu Brodeur avec qui les conversations furent toujours captivantes.

Je n'oublie pas non plus mes parents et amis qui, bien qu'ils aient pu parfois souffrir de mon absence, ne m'ont jamais oublié sous mes livres et m'ont donné du courage dans les moments difficiles. Un merci particulier à Kathy Dupont dont l'agréable compagnie et l'éternel support vaudront toujours plus que toutes les sciences et tous les diplômes.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ .....	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 L'importance du cholestérol.....	1
1.2 La membrane plasmique.....	12
1.3 Le trafic cellulaire .....	17
1.4 Les voies d'entrée dans la cellule.....	19
CHAPITRE II	
PROBLÉMATIQUE.....	31
CHAPITRE III	
HYPOTHÈSES .....	33
CHAPITRE IV	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	36
CHAPITRE V	
RÉSULTATS .....	44
CHAPITRE VI	
DISCUSSION .....	68
CONCLUSION .....	81
BIBLIOGRAPHIE .....	82

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Effet des inhibiteurs classiques de l'endocytose sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL <sub>3</sub> . .....	43
Figure 2: Effet du choc hyperosmotique, de la privation en ATP, du NH <sub>4</sub> Cl et de la chlorpromazine sur l'internalisation et le recyclage de la <sup>125</sup> I-transferrine et la dégradation des <sup>125</sup> I-LDL. ....	44
Figure 3: Effet de la chlorpromazine et du NH <sub>4</sub> Cl sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL <sub>3</sub> . ....	46
Figure 4: Effet des inhibiteurs classiques de l'endocytose sur la liaison protéique à 4 °C des <sup>125</sup> I-LDL et -HDL <sub>3</sub> . ....	47
Figure 5: Effet de la cytochalasine D sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et EC-HDL <sub>3</sub> . ....	50
Figure 6: Effet des inhibiteurs de protéines tyrosine kinases sur la captation sélective des EC-LDL ou -HDL <sub>3</sub> . ....	51
Figure 7: Effet des inhibiteurs de protéines tyrosine kinases sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL <sub>3</sub> dans des cellules surexprimant la cavéoline 1. ....	52
Figure 8: Effet du pervanadate de sodium sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL <sub>3</sub> . ....	54
Figure 9: Effet du dynasore sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL <sub>3</sub> . ....	55
Figure 10: Effet du dynasore sur l'internalisation et le recyclage de la <sup>125</sup> I-transferrine. ....	56
Figure 11: Effet de l'expression de la dynamine-2 mutante (Dyn2 <sup>K44A</sup> ) dans les cellules HepG2 sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL <sub>3</sub> . ....	57
Figure 12: Effet de la toxine B de <i>C. difficile</i> sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL <sub>3</sub> . ....	58
Figure 13: Voie de synthèse des (glyco)sphingolipides. ....	60

Figure 14: Effet de la myriocine sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL <sub>3</sub> . .....	61
Figure 15: Effet du FB <sub>1</sub> et NB-DGJ sur la captation sélective des LDL et HDL <sub>3</sub> . .....	62
Figure 16: Effet de la chlorpromazine, de la méthyl-β-cyclodextrine et de la sphingomyélinase (SMase) sur la localisation membranaire du SR-BI. ....	63
Figure 17: Effet des différents inhibiteurs d'endocytose sur la localisation membranaire de SR-BI.....	64
Figure 18: Effet de la déplétion en énergie sur la localisation membranaire du SR-BI. ....	65
Figure 19: Effet de la toxine B de <i>C. difficile</i> sur la localisation membranaire de SR-BI. ....	66

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Synthèse des caractéristiques propres à chacune des voies endocytaires. ....	25
Tableau II: Effet des différents traitements inhibant l'endocytose sur l'hydrolyse des EC-LDL .....	48
Tableau III: Effet des différents traitements inhibant l'endocytose sur l'hydrolyse des EC-HDL <sub>3</sub> .....	49
Tableau IV: Récapitulatif de l'effet des inhibiteurs de l'endocytose. ....	67

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.:	acide aminé
AcLDL:	LDL acétylée
Apo:	Apolipoprotéine
ARC:	<i>Apical recycling compartment</i> (Compartiment de recyclage apical)
Arf:	<i>Adenosine ribosylation factor</i>
ATP:	Adénosine triphosphate
Cav:	Cavéoline
CD:	<i>Cluster of differentiation</i>
CETP:	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
CH:	Cholestérol
CM:	Chylomicron
CoA:	Coenzyme A
CS:	Captation sélective
CDTxB	Sous-unité B de la toxine B de <i>Clostridium difficile</i>
DRM:	<i>Detergent resistant membranes</i>
EC:	Ester de cholestérol
EE:	<i>Early endosome</i> (Endosome précoce)
EEA1:	<i>Early endosome antigen 1</i>
EGF:	<i>Epidermal growth factor</i>
rEGF:	Récepteur à l'EGF
ERC:	Endosomal recycling compartment (Endosome de recyclage)
GEEC:	<i>GPI-AP enriched early compartment</i>
GM:	Ganglioside M
GPI:	Glycosylphosphatidylinositol
GPI-AP:	<i>Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein</i>
GDP:	Guanosine diphosphate

GTP:	Guanosine triphosphate
HDL:	Lipoprotéine de haute densité
HMG-CoA:	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA
IDL:	Lipoprotéine de densité intermédiaire
LCAT:	Lécithine: cholestérol acyltransférase
LE:	<i>Late endosome</i> (Endosome tardif)
LDL:	Lipoprotéine de faible densité
LPL:	Lipoprotéine lipase
m $\beta$ -CD:	Méthyl-béta-cyclodextrine
MVB:	<i>Multivesicular body</i> (Corps multivésiculaire)
OxLDL:	LDL oxydées
Rab:	<i>Ras like in rat brain</i>
RE:	Reticulum endoplasmique
rLDL:	Récepteur de LDL
SAC:	<i>Sub-apical compartment</i> (Compartiment sous-apical)
SR-BI:	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
SRE:	<i>Sterol regulatory element</i>
SREBP:	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
SV40:	<i>Simian virus 40</i>
TIC:	Transport inverse du cholestérol
TEM:	<i>Tetraspanin-enriched microdomain</i>
Tf:	Transferrine
rTf:	Récepteur de la transferrine
TG:	Triglycéride
VLDL:	Lipoprotéine de très faible densité
WT:	<i>Wild type</i> (type sauvage)

## RÉSUMÉ

Le récepteur *scavenger* de classe B type I (SR-BI) est essentiel au transport inverse du cholestérol puisqu'il en effectue la dernière étape: la captation sélective (CS) des esters de cholestérol (EC) à partir des lipoprotéines, c'est-à-dire l'internalisation de leurs EC sans dégradation de leur portion protéique. Au niveau hépatique, ce mécanisme d'importance demeure cependant mal défini. Nous avons déjà montré qu'un mécanisme de rétroendocytose était responsable de la CS dans des cellules HepG2 et que la CS dépendait de la localisation membranaire du SR-BI. Ici, nous vérifions si des voies d'endocytose, qui sont indépendantes de la clathrine et dépendent de microdomaines membranaires comme les radeaux lipidiques, ne pourraient pas expliquer l'activité du SR-BI à l'égard des LDL et HDL<sub>3</sub>. Le traitement des cellules avec des inhibiteurs «classiques» de l'endocytose (NH<sub>4</sub>Cl; choc hyperosmotique, privation d'ATP, chlorpromazine (CPZ)), puis le traitement avec des inhibiteurs différenciant ces voies selon qu'elle dépendent ou non de la dynamine-2 (dynasore) ou de GTPases de la famille de Rho (sous unité B de la toxine de *C. difficile* (CDTxB)) révèlent que le SR-BI ne se conduit pas de façon identique à l'égard des deux ligands. Les résultats indiquent que la CS des EC-HDL<sub>3</sub>, de par sa sensibilité aux NH<sub>4</sub>Cl et CPZ et par son augmentation en présence de dynasore ou de CDTxB, serait effectuée par endocytose suivant une voie dépendant de la clathrine et qu'elle pourrait être régulée négativement par une voie dépendant de RhoA. La CS des EC-LDL, sensible à la CPZ et augmentée par la CDTxB, pourrait dépendre, elle, d'une voie d'endocytose régulée par Cdc42 ou la flotilline. En somme, les résultats permettent une caractérisation plus approfondie de la CS et les différences de régulation de la CS envers les deux principales classes de lipoprotéines chez l'humain s'ajoutent à celles déjà mises en évidence par nous.

Mots-clés: lipoprotéines, cholestérol, endocytose indépendante de la clathrine, radeaux lipidiques, cellules hépatiques.

# CHAPITRE I: INTRODUCTION

## 1.1 L'importance du cholestérol

Le cholestérol est un constituant d'importance dans les systèmes biologiques. Qu'il soit utilisé dans la synthèse d'hormones stéroïdiennes ou de sels biliaires, incorporé aux membranes biologiques, leur conférant ainsi une plus grande stabilité, ou qu'il agisse comme élément régulateur de l'activité de nombreuses enzymes ou de l'expression de nombreux gènes liés au métabolisme des lipides, le cholestérol, de par sa quasi-ubiquité, est essentiel au maintien de l'intégrité cellulaire et même de la vie.

Dans les tissus extra hépatiques, la majeure partie du cholestérol résulte de la synthèse *de novo* alors que les hépatocytes l'obtiennent du milieu par des voies de captation médiée par des récepteurs à partir des lipoprotéines contenues dans le plasma sanguin (Liscum, 2002). La synthèse *de novo* à partir d'acétyl-Coenzyme A (CoA) ou d'acétoacyl-CoA est le résultat d'un grand nombre de réactions enzymatiques appartenant à la voie métabolique des composés isoprénoïdes et qui se produisent à la fois dans le cytosol et à la membrane du réticulum endoplasmique et des peroxysomes (revu dans Goldstein et Brown, 1990). Le facteur limitant de la synthèse *de novo* du cholestérol est la réduction du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl (HMG)-CoA en mévalonate par la HMG-CoA réductase, enzyme dont l'activité est fortement régulée (Ness et Chambers, 2000; revu par Sato et Takano, 1995) et qui constitue, par le fait même, une cible d'agents thérapeutiques (comme les statines) pour contrer l'hypercholestérolémie (Istvan et Deisenhofer, 2000).

### 1.1.1 Les lipoprotéines

En circulation, le cholestérol se trouve, sous sa forme estérifiée, associé à des complexes lipoprotéiniques. Les lipoprotéines sont composées d'une monocouche phospholipidique

amphiphile à laquelle sont ajoutées des molécules de cholestérol non estérifié, d'une portion protéique (les apolipoprotéines (apo)) et d'un cœur hydrophobe contenant des esters de cholestérol et des triglycérides (TG). Leur présence dans le plasma sanguin est le résultat de leur assemblage et de leur sécrétion par les entérocytes et les hépatocytes.

On distingue généralement quatre grandes classes de lipoprotéines en fonction de leur densité intrinsèque. La classification en lipoprotéines de très faible densité (VLDL;  $0,94 \text{ g/ml} < d < 1,006 \text{ g/ml}$ ), de densité intermédiaire (IDL;  $1,006 < d < 1,019$ ), de faible densité (LDL;  $1,019 \text{ g/ml} < d < 1,063 \text{ g/ml}$ ) et de haute densité (HDL;  $1,063 \text{ g/ml} < d < 1,210 \text{ g/ml}$ ) reflète leur contenu relatif en lipides et en protéines: les plus denses possédant une portion protéique plus importante que la portion lipidique. On les reconnaît comme étant associées positivement aux maladies cardio-vasculaires (Gordon *et al.*, 1981). On classe aussi les lipoprotéines en fonction de leur mobilité électrophorétique sur gel d'agarose en lipoprotéines  $\alpha$ , pré- $\beta$  et  $\beta$  qui correspondent respectivement aux HDL, VLDL et LDL (Skipski, 1972). Ces classes sont elles-mêmes constituées de lipoprotéines hétérogènes en termes de taille, de densité, de contenu en apolipoprotéine et en lipide, et de propriété fonctionnelle.

Les lipoprotéines sont en constant changement au niveau de leur taille et de leur contenu en lipides. Ces changements s'effectuent alors qu'elles sont en circulation et sont le résultat de l'action d'enzymes comme la LPL, associée aux cellules endothéliales, qui hydrolyse les TG des VLDL et chylomicrons (CM) en acides gras (Hayden et Henderson, 1999) et la lécithine: cholestérol acyltransférase (LCAT), présente dans le plasma, qui estérifie le cholestérol libre des HDL (Glomset, 1968). Les LDL proviennent de la lipolyse dans le plasma des VLDL (sécrétées par le foie) par deux enzymes: la lipoprotéine lipase (LPL) et la lipase hépatique (Fielding et Fielding 2002). La *cholesteryl ester transfer protein* (CETP), elle, est en mesure de transférer les EC des HDL (générées par la LCAT) vers les VLDL et les LDL et les TG de celles-ci vers les HDL. Toutes ces réactions enzymatiques sont hautement régulées par l'échange d'apolipoprotéines hydrosolubles entre les lipoprotéines du plasma: la LPL est activée par l'apoC-II (Breckenridge *et al.*, 1978) et est inhibée par les apoC-I et C-III (Brown et Baginsky, 1972); la LCAT est activée par l'apoA-I (Fielding *et al.*, 1972) et les apoE,

apoA-IV et apoC-I (revu par Jonas, 1991). Des hormones comme l'insuline activent aussi la LPL (Taskinen *et al.*, 1992) et en augmentent la transcription (Fried *et al.*, 1993).

D'un point de vue physiologique, la caractéristique la plus importante des lipoprotéines se situe au niveau fonctionnel. On peut séparer les lipoprotéines entre celles qui «apportent» les lipides (principalement les TG et les EC) de l'intestin ou du foie vers les tissus périphériques et celles qui «ramènent» les lipides (principalement le cholestérol (CH) ou les esters de cholestérol (EC)) des tissus vers le foie. Les premières sont caractérisées par la présence d'une apoB (apoB-48 ou apoB-100) et sont constituantes des chylomicrons (synthétisés par les entérocytes;  $d < 0,94$  g/ml), des VLDL et des LDL. Les secondes peuvent contenir jusqu'à quatre molécules d'apoA-I: ce sont les HDL. Elles proviennent de la synthèse hépatique et d'une maturation intravasculaire (Fielding et Fielding, 2002) et sont anti-athérogènes car leur rôle est de ramener le cholestérol en excès des tissus périphériques vers le foie pour leur excrétion (Gordon et Rifkind, 1989). L'électrophorèse sur gel non dénaturant permet de séparer davantage les HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub> en HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> et en HDL<sub>3c</sub> (Blanche *et al.*, 1981). Les LDL aussi peuvent être séparées en sous-classes en fonction de leur densité et de leur taille (Shen *et al.*, 1981).

Les LDL et les HDL étant les deux principales classes de lipoprotéines chez l'humain, nous nous y attarderons donc davantage et décrirons leurs spécificités.

### 1.1.2 La LDL et son récepteur, le récepteur de LDL

Les LDL ( $1,006 < d < 1,063$ ) sont caractérisées par la présence d'une molécule d'apoB-100 et sont synthétisées dans les hépatocytes (Marsh et Whereat, 1959). L'assemblage des LDL nécessite la synthèse à la fois d'apoB-100, de TG, d'EC et de phospholipides (Vance, 2002). La synthèse d'apoB-100 (4536 acides aminés (a.a.)) est généralement constitutive dans les hépatocytes, mais sa translocation dans la lumière du reticulum endoplasmique (RE) lors de sa traduction ne peut être complétée en l'absence de lipides pour s'y associer. La présence de

résidus cystéine dans la portion N-terminale de l'apoB-100 est essentielle pour que cette protéine s'associe aux lipides et soit sécrétée (Huang et Shelness, 1997).

Il existe une corrélation directe entre l'incidence de maladies cardio-vasculaires et le taux de cholestérol associé au LDL dans le plasma sanguin (Castelli *et al.*, 1977, Gordon *et al.*, 1981). Brièvement, lorsque présentes en trop grande concentration, les LDL pénètrent l'espace sous-endothélial des parois artérielles et s'y accumulent (Steinberg *et al.*, 1989). Les cellules de la paroi artérielle (cellules endothéliales, musculaires et macrophages) libèrent dans le milieu extracellulaire des formes réactives d'oxygène qui oxydent les LDL, ce qui leur confère une charge négative et leur permet alors d'être internalisées par les récepteurs éboueurs des macrophages (Henriksen *et al.*, 1981). Ceci résulte en une accumulation de LDL oxydées dans la paroi artérielle (Simionescu *et al.*, 1989). Le processus inflammatoire qui s'en suit permet alors une plus grande entrée de monocytes dans l'espace sous-endothélial (Berliner *et al.*, 1990). Les monocytes différenciés en macrophages se gorgent de cholestérol, et deviennent alors des cellules spumeuses qui sont retenues dans la paroi artérielle, entraînant éventuellement la nécrose et la formation de plaques athéromateuses (Revu dans Tabas, 2002).

La prise en charge par les cellules des LDL en circulation est permise par le récepteur de LDL (rLDL), une glycoprotéine membranaire intégrale de 839 résidus. Le rLDL est codé par un gène de 48 kpb composé de 18 exons localisés sur le chromosome 19. Il est composé de 5 domaines : un domaine lui permettant d'interagir avec le ligand, un domaine d'homologie avec le précurseur de l'*epidermal growth factor* (EGF), un domaine hautement O-glycosylé, un domaine d'ancrage à la membrane et une queue cytoplasmique (Schnieder, 2002). Les 40 résidus de la portion N-terminale constituent le domaine de liaison au ligand et permettent au rLDL d'interagir avec les lipoprotéines contenant une apoB-100 ou une apoE (Esser *et al.*, 1988). Le rLDL est localisé dans des régions de la membrane où se trouvent les molécules de clathrine. Le mécanisme d'internalisation du rLDL (revu par Goldstein *et al.*, 1985) est hautement régulé et implique une multitude de molécules. Il sera décrit dans une prochaine section.

La translocation du rLDL du golgi à la membrane basolatérale de l'hépatocyte requiert la présence de deux motifs dans son domaine cytoplasmique: NPXY et TXX $\phi$  (Matter *et al.*, 1992). NPXY (où N, P, et Y représentent respectivement un résidu asparagine, un résidu proline et un résidu tyrosine et où X représente n'importe quel acide aminé) est le premier motif de reconnaissance à avoir été déterminé dans le mécanisme associé à la clathrine (Anderson *et al.*, 1977). Présent sur le rLDL, dans la partie proximale du domaine cytoplasmique, ce motif est essentiel à la localisation membranaire du rLDL, mais surtout à son internalisation (Lehrman *et al.*, 1987). Bien qu'il soit connu que ce motif permette au rLDL d'interagir avec le domaine terminal des molécules de clathrine et avec la protéine adaptatrice AP-1 (Kibbey *et al.*, 1998), le mécanisme précis qui conduit à l'internalisation par reconnaissance de ce motif demeure obscur. Une mutation conduisant à une perte de ce motif sur le rLDL conduit à une incapacité à internaliser ce dernier provoquant une forme d'hypercholestérolémie sévère (Lehrman *et al.*, 1985).

Depuis la découverte du rLDL par Goldstein et Brown (1973), plus de 800 mutations dans son gène, conduisant à une forme plus ou moins sévère d'hypercholestérolémie familiale, ont été découvertes et caractérisées. Ces mutations peuvent être présentes dans toutes les régions codantes (revu dans Soutar et Naoumova, 2007) révélant l'importance de chacun des domaines de cette protéine. Ainsi on peut classer ces mutations en cinq groupes: celles conduisant à des phénotypes ne pouvant lier les LDL; celles inhibant le transport; celles empêchant l'internalisation; celles empêchant le recyclage; et celles conduisant à l'absence de rLDL (Hobbs *et al.*, 1990). À titre d'exemple, et en lien avec les motifs d'importance dans la localisation précédemment mentionnés, il existe une mutation G34D qui provoque la perte du motif du domaine cytoplasmique glycine-tyrosine conservé (TyrXX $\phi$ ) permettant la localisation du rLDL à la membrane basolatérale (Koivisto *et al.*, 1995). Cette mutation provoque l'hypercholestérolémie que l'on nomme FH-Turku. L'expression de ce récepteur muté dans des hépatocytes conduit à son expression dans le domaine apical de la membrane (Koivisto *et al.*, 2001), cependant sa capacité d'endocytose n'est pas affectée.

L'expression du rLDL est régulée au niveau transcriptionnel par la présence intracellulaire de cholestérol et de certains intermédiaires de la voie de synthèse du cholestérol. Le promoteur du gène du rLDL contient une séquence SRE (*Sterol regulatory element*) (5'-ATCACCCAC-3') (Smith *et al.*, 1990) qui est liée par des protéines de la famille de SREBP (*Sterol regulatory binding protein*) en absence de cholestérol (Briggs *et al.*, 1993). Les SREBP sont présents sous trois isoformes: SREBP-1a et SREBP-1c, qui sont codées par un même gène et dont l'expression différentielle est régulée par un mécanisme d'épissage alternatif, et SREBP-2 (Hua *et al.*, 1995). Ces protéines ont un domaine de type *basic loop-helix-loop – leucine zipper* (bLHL-ZIP) (Wang *et al.*, 1993), qu'il s'agisse de SREBP-1a, SREBP-1c (Yokoyama *et al.*, 1993) ou de SREBP-2 (Hua *et al.*, 1993). En présence de cholestérol, SREBP-2 est maintenu dans la membrane du RE. La protéine SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*), une chaperonne présente dans la membrane du RE et liant le cholestérol, réagit aux diminutions de cholestérol dans la membrane du RE. Une telle réduction dans la quantité relative de cholestérol dans la membrane de RE provoque le déplacement de SREBP-2 vers le Golgi (Hua *et al.*, 1996) où se trouvent les S1P (*site-1 protease*), une sérine protéase (Sakai *et al.*, 1998), et S2P (*site-2 protease*), une métalloprotéase (Rawson *et al.*, 1997), qui le clivent, permettant ainsi au domaine de liaison à l'ADN de migrer vers le noyau et de lier la séquence SRE présente en amont du gène du rLDL et de plusieurs autres gènes du métabolisme du cholestérol et d'en activer la transcription.

Il existe aussi un mécanisme post-traductionnel permettant de réguler la présence du rLDL. Ce dernier est médié par PCSK9 (*Proprotein convertase subtilisin-like kexin type 9*), une des multiples protéines dont la transcription est activée par SREBP-2 (Horton *et al.*, 2003). PCSK9 est une subtilase appartenant à la sous-famille des protéinases K (Seidah *et al.*, 2003) qui est sécrétée dans le milieu extracellulaire et se lie au rLDL conduisant à son internalisation et à sa dégradation plutôt qu'à son recyclage. PCSK9 peut aussi se lier au rLDL dans un compartiment de la voie de biosynthèse, possiblement le Golgi ou le réseau trans-golgien (Maxwell *et al.*, 2005). Une multitude de mutations a été découverte dans ce gène (revu dans Lambert, 2007): un gain de fonction conduisant habituellement à une forme

d'hyperbetalipoprotéinémie et une perte de fonction, à un très faible taux de lipoprotéines contenant de l'apoB.

### 1.1.3 La HDL et son principal récepteur, le récepteur *scavenger* de classe B type I (SR-BI)

Chaque HDL contient au moins une copie de l'apoA-I, une protéine de 243 a.a. sécrétée par les hépatocytes et les entérocytes dans le plasma sous la forme d'une proprotéine de 249 a.a. (Zannis *et al.*, 1983). L'apoA-I est formée de plusieurs répétitions de 22 a.a. qui, en présence de phospholipides et de cholestérol, forment des hélices- $\alpha$  amphipathiques avec les résidus chargés orientés vers le milieu aqueux et les résidus non-polaires orientés vers les chaînes acylées des phospholipides (revu dans Segrest *et al.*, 1992). Ces lipides proviennent de l'action de la LPL sur les VLDL et les CM ainsi que des cellules notamment par un mécanisme d'efflux. Selon le niveau de maturation, les HDL peuvent être de type pré- $\beta$ 1 (5-6 nm) pauvres en lipide; pré- $\beta$ 2 ou discoïdales contenant trois molécules d'apoA-I; et sphériques (9-12 nm) auxquelles appartiennent les sous-classes mentionnées dans la première section (Fielding et Fielding, 2002). L'efflux de cholestérol et de phospholipides à partir des cellules vers les HDL est médié par ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*), un transporteur associé à la membrane des cellules et appartenant à la superfamille des protéines ABC (revu par Dean *et al.*, 2001).

Le rôle physiologique des HDL est important puisque la concentration plasmatique de HDL sphériques (ou matures) est habituellement corrélée avec une diminution de l'incidence des maladies cardiovasculaires (Castelli *et al.*, 1977; Gordon et Rifkind, 1989). En effet, les HDL jouent un rôle d'importance dans le transport inverse du cholestérol, en ramenant le cholestérol des tissus périphériques vers le foie où l'apoA-I peut se lier au récepteur *scavenger* de classe B type I (SR-BI) (Krieger, 1999). La clairance hépatique du cholestérol en provenance des HDL contenant l'apoA-I conduit efficacement à la production de bile (Pieters *et al.*, 1993; Kozarsky *et al.*, 1997). On attribue aussi aux HDL un rôle anti-inflammatoire (revu par Mineo *et al.*, 2006) puisqu'elles ont la capacité de promouvoir la

synthèse d'oxyde nitrique, un puissant vasodilatateur, dans les vaisseaux sanguins, de diminuer l'apoptose des cellules endothéliales vasculaires et de stimuler la production de prostacycline, un membre de la famille des eïcosanoïdes.

Le SR-BI est une protéine membranaire hautement glycosylée (82-85 kDa), composée de 509 acides aminés (Acton *et al.*, 1994), qui est exprimée dans de multiples tissus d'importance pour le transport et le métabolisme des lipides, notamment l'intestin (Cai *et al.*, 2001), le foie et les organes stéroïdogènes (Landschulz *et al.*, 1996). Des analyses de la séquence d'acides aminés prédisent que ce récepteur comporte deux domaines transmembranaires et deux queues cytoplasmiques (Calvo et Vega, 1993), ce qui lui donne la forme d'un fer à cheval inversé ancré dans la membrane. L'expression de SR-BI est régulée au niveau transcriptionnel notamment par la présence dans la région du promoteur de son gène de deux séquences consensus de type E-box (Cao *et al.*, 1997) liés par des facteurs de transcription de type bHLH en réponse à des facteurs stéroïdogènes et par la présence d'une séquence SRE à laquelle SREBP-1 peut s'associer (Kim *et al.*, 1995) en réponse à une diminution de cholestérol intracellulaire. *In vivo*, il a été montré que l'expression hépatique de SR-BI augmentait chez des hamsters nourris avec une diète riche en acides gras polyinsaturés d'origine végétale (Spady *et al.*, 1999). On sait aussi que la présence de LDL oxydées (oxLDL) dans le plasma diminue l'expression de SR-BI dans les macrophages (Han *et al.*, 2001). Dans les tissus exprimant la cavéoline-1 à la membrane, comme les cellules surrénaliennes, le SR-BI est localisé dans les cavéoles et est copurifié avec la cavéoline-1 (Babitt *et al.*, 1997). Dans les hépatocytes (HepG2), il a été montré qu'il est localisé dans des radeaux lipidiques dépourvus de cavéoline-1 (Rhainds *et al.*, 2004). Dans les cellules polarisées comme les cellules épithéliales de la vésicule biliaire (Miquel *et al.*, 2003), les cellules de Sertoli (Nakagawa *et al.*, 2004) ou les hépatocytes de souris en culture primaire (Sehayek *et al.*, 2003), le SR-BI est localisé dans le domaine apical et le domaine basolatéral de la membrane.

Le SR-BI, étant un récepteur de type *scavenger*, a la capacité d'interagir avec une multitude de ligands. Des études ont rapporté que les hépatocytes pouvaient lier et dégrader des

lipoprotéines modifiées comme des oxLDL et les LDL acétylées (AcLDL) (Kamps *et al.*, 1992). Le groupe de Krieger (Acton *et al.*, 1994) a ensuite démontré que des cellules surexprimant le SR-BI avaient aussi cette capacité. Cette même étude a aussi montré que le SR-BI pouvait lier les LDL natives ainsi que l'albumine de sérum bovin (BSA) maléylée (M-BSA). La BSA modifiée par les produits terminaux de la glycation (AGE-BSA) est aussi un ligand du SR-BI (Myazaki *et al.*, 2002). Le SR-BI a aussi été identifié comme étant le principal récepteur de haute affinité des HDL (Acton *et al.*, 1996). Des études de compétition ont suggéré que ces différents ligands n'occupent pas tous le même site de liaison sur le SR-BI (Rhainds *et al.*, 1999) et que leur internalisation ne conduisait pas nécessairement à leur dégradation (Ohgami *et al.*, 2001).

Il a été montré que le SR-BI joue un rôle d'importance physiologique alors que sa sous-expression chez la souris conduisait à une diminution de la clairance des EC-HDL (Brodeur *et al.*, 2005) et une perte de captation sélective (décrite plus bas) au niveau hépatique (Out *et al.*, 2004; Brundert *et al.*, 2005) et dans des cultures primaires d'hépatocytes murins (Rhainds *et al.*, 2003). De plus, une réduction de l'étendue de l'athérosclérose (lésions aortiques) a été montrée chez des souris transgéniques surexprimant le SR-BI, mais déficiente en rLDL, à qui ont été administré une diète riche en lipides (Arai *et al.*, 1999).

#### 1.1.4 La captation sélective

En plus de lier les lipoprotéines, le SR-BI peut médier la captation sélective des esters de cholestérol qu'elles contiennent (Acton *et al.*, 1996). Le phénomène de captation sélective implique l'internalisation des esters de cholestérol sans qu'il n'y ait dégradation de la lipoprotéine (Glass *et al.*, 1983; Stein *et al.*, 1983). Liu et Krieger (2002) ont démontré qu'une fraction purifiée de SR-BI associée à des liposomes peut médier ce transfert à partir des HDL.

Le mécanisme de captation sélective via le SR-BI est encore aujourd'hui sujet à la controverse. En effet, les expériences mentionnées plus haut (Liu et Krieger, 2002) de transfert vers des liposomes suggèrent que l'activité de SR-BI ne nécessite pas de machinerie cellulaire. Ce mécanisme se produirait en deux étapes (Liu *et al.*, 2002), une étape de liaison de la lipoprotéine au SR-BI et une étape de transfert lipidique vers la membrane. Nous ne pouvons cependant savoir si ce mécanisme ne représente pas seulement une activité basale de faible intensité. On rapporte aussi que SR-BI formerait un pore membranaire hydrophobe facilitant le transfert d'EC suivant un gradient de concentration sans qu'il n'y ait internalisation du récepteur (Rodrigueza *et al.*, 1999). L'inversion du gradient de concentration conduirait quant à elle à l'efflux de cholestérol (Ji *et al.*, 1997). De plus, il a été suggéré que l'étape de transfert membranaire des EC puisse impliquer (Acton *et al.*, 1996; Muraio *et al.*, 1997) ou non un phénomène de rétroendocytose (Eckhardt *et al.*, 2004; Nieland *et al.*, 2005; Harder *et al.*, 2006) dépendant des types cellulaires, des différentes espèces ou des méthodes employées.

La captation sélective ne se produit pas qu'à partir des HDL. Il a été montré que des cellules HepG2 pouvaient effectuer la captation sélective des EC en provenance des IDL (lipoprotéines de densité intermédiaire;  $1,006 < d < 1,019$ ) (Brissette et Falstrault, 1994) et de LDL (Brissette *et al.*, 1996). Plus encore, des cellules HepG2 sous-exprimant le rLDL captent la même quantité d'esters de cholestérol dérivés de LDL que des cellules normales alors que la dégradation diminue de 82% (Izem *et al.*, 1998). Ces résultats ont été confirmés avec des

hépatocytes de souris n'exprimant pas de rLDL (rLDL KO) (Truong *et al.*, 2000). Révélant l'importance physiologique de la captation sélective des EC-LDL, nous avons aussi montré que la captation sélective des EC-LDL se produisait aussi *in vivo* (Brodeur *et al.*, 2005). En effet, des études de clairances menées chez la souris ont montré que les EC-LDL disparaissaient de la circulation plus rapidement que la portion protéique de cette lipoprotéine et que le SR-BI était responsable de l'activité de captation sélective puisque ce phénomène n'était pas montré dans des souris qui n'expriment pas le SR-BI (SR-BI KO). De plus, la surexpression du SR-BI chez la souris diminue l'hyperbétalipoprotéïnémie induite par une diète riche en lipides (Wölle *et al.*, 1995) et favorise une réduction à la fois des lipoprotéines en circulation contenant de l'apoA-I et une réduction de celles contenant de l'apoB (VLDL et LDL) (Wang *et al.*, 1998). On rapporte aussi que les LDL modifiées (oxLDL et AcLDL) peuvent participer au phénomène de captation sélective médiée par SR-BI (Fluiter et Van Berkel, 1997; Rhoads *et al.*, 1999).

Ces différents ligands du SR-BI ne sont cependant pas traités de la même façon par les cellules hépatiques et notre groupe a, par le passé, démontré plusieurs différences entre la captation sélective des EC à partir des LDL et celle effectuée à partir des HDL. On rapporte que des hépatocytes sous-exprimant l'apoE effectuent moins de captation sélective pour ces deux ligands, mais que la surexpression de cette apolipoprotéine favorise le transfert de EC dans un compartiment insensible aux effets de la chloroquine (un agent inhibiteur de l'hydrolyse lysosomale) seulement à partir des HDL et non à partir des LDL (Charpentier *et al.*, 2000). D'autres apolipoprotéines régulent différenciellement la captation sélective de EC-HDL et EC-LDL, comme les apoC-II et apoC-III (Huard *et al.*, 2005). La surexpression de ces deux apolipoprotéines inhibe la captation sélective à partir des deux ligands, alors que la sous-expression d'apoC-II favorise la captation sélective des EC-HDL seulement. La surexpression de la cavéoline-1 dans des hépatocytes (Truong *et al.*, 2006) favorise la captation sélective des EC-HDL, mais non celle effectuée à partir des LDL qui sont alors prises en charge préférentiellement par la voie du rLDL.

Récemment, plusieurs études employant des inhibiteurs de l'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine ont été menées et ont ainsi permis d'en apprendre davantage sur le mécanisme de captation sélective, suggérant un possible rôle de mécanismes d'endocytose indépendante de la clathrine lors du transfert des EC médié par le SR-BI. Ainsi, il a été montré que l'inhibition de l'endocytose avec un choc hypertonique ou par privation d'ions potassium ou d'énergie cellulaire dans des cellules CHO surexprimant le SR-BI empêchait la captation sélective des EC-HDL (Zhang *et al.*, 2007). De plus, Wüstner *et al.* (2004) ont mis en évidence l'augmentation du transfert de cholestérol vers le canalicule biliaire lorsque les cellules sont traitées pour être privées d'ATP. Il a aussi été démontré que l'internalisation des oxLDL médiée par le SR-BI était dépendante de la dynamine (Sun *et al.*, 2007). Aussi, le traitement de cellules avec de la sphingomyélinase (SMase) et la cholestérol oxidase, ce qui a comme effet de perturber l'intégrité des radeaux lipidiques, diminue la captation sélective des EC-LDL et augmente celle des EC-HDL (Rhainds *et al.*, 2004). Dans cette même étude, il est montré que la séquestration du cholestérol membranaire à l'aide de la filipine III diminuait aussi la CS des EC-LDL sans que celle des EC-HDL<sub>3</sub> ne soit affectée et que la captation sélective des EC-LDL et EC-HDL<sub>3</sub> se produisait effectivement par un mécanisme de rétroendocytose (Rhainds *et al.*, 2004). D'autres ont ensuite confirmé que c'était bien le cas pour la captation sélective des EC-HDL (Sun *et al.*, 2006; Pagler *et al.*, 2006). Il a aussi été montré dans des cellules hépatiques polarisées (WIF-B) que la liaison de HDL au SR-BI conduisait à la transcytose du récepteur de la membrane basolatérale vers le canalicule biliaire par un mécanisme dépendant de la présence d'EC (Harder *et al.*, 2006).

## 1.2 La membrane plasmique

En 1972, Singer et Nicholson (Singer et Nicholson, 1972) établissaient un modèle décrivant la structure des membranes biologiques et des protéines qu'elles contiennent qui demeure encore aujourd'hui le modèle dominant: la mosaïque fluide. Ce modèle décrit les membranes comme une bicouche moléculaire de nature amphipathique, composée de phospholipides dont la tête polaire est orientée vers le milieu aqueux et dont les chaînes hydrocarbonées

hydrophobes sont orientées pour se rejoindre au milieu. Les principaux composants lipidiques de la membrane appartiennent à la grande famille des glycérophospholipides. Cette dernière est composée de: phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine, phosphatidylglycérol, diphosphatidylglycérol, phosphatidylinositol (Dowhan, 1997). À ces derniers s'ajoutent des stérols, des (glyco)sphingolipides (dérivés de la sphingosine) et des glycolipides. Ensemble, ces constituants formeraient alors une couche de type liquide désordonné ( $L_d$ ). Ce modèle propose aussi que les protéines de la membrane soient des molécules globulaires dont les groupements non polaires sont disposés dans le milieu créé par les queues hydrophobes des phospholipides et dont les groupements polaires sont exposés à la phase aqueuse environnante, la bicouche agissant comme un solvant neutre. Cet agencement de phospholipides et de protéines se fait de façon discontinue bien que certains lipides interagissent directement avec les protéines membranaires.

### 1.2.1 Radeaux lipidiques

Le modèle de structure quasi-homogène et de fluidité de la membrane plasmique s'oppose désormais à un modèle où émergent des domaines à la composition lipidique fort différente: les radeaux lipidiques (Simons et van Meer, 1988; Simons et Ikonen, 1997). Ces domaines sont décrits comme un assemblage dynamique de sphingolipides et de cholestérol dans le feuillet exoplasmique de la membrane cellulaire dont les chaînes hydrocarbonées saturées permettent ainsi la formation d'une phase de type liquide ordonné ( $L_o$ ) (Brown et London, 1998). Les radeaux lipidiques sont caractérisés par leur faible densité et leur grande flottabilité sur un gradient de densité ainsi que par leur insolubilité à 4°C dans des détergents non ioniques comme le Triton X-100 (Brown et Rose, 1992) d'où l'autre nom qu'on leur donne: DRM (*Detergent resistant membranes*).

Une propriété importante des radeaux lipidiques est que ces domaines ont la capacité d'inclure ou d'exclure plusieurs protéines (Harder *et al.*, 1998), ce qui, nous le verrons bientôt, conduit à la formation de différents types ou classes de radeaux. Ainsi, l'ajout, dans

le RE, d'un ancrage de glycosylphosphatidylinositol à l'extrémité carboxyterminale d'une protéine (GPI-AP) permet son association à ces domaines (Hooper, 1999). Ceci concorde avec l'observation de GPI-AP localisées dans la portion apicale de la membrane des cellules polarisées (Lisanti *et al.*, 1989). Parmi les protéines qui possèdent une affinité pour les radeaux lipidiques, on compte des protéines servant à la signalisation cellulaire (revu par Simons et Toomre, 2000) comme des protéines doublement acylées (famille des Src kinases, sous-unité  $\alpha$  des protéines G hétérotrimériques) (Resh, 1999). Il a été démontré que l'ajout au milieu de culture d'acides gras polyinsaturés défaisait l'intégrité des radeaux lipidiques, ce qui a comme résultat de dissocier les protéines doublement acylées des radeaux lipidiques (Webb *et al.*, 2000). Le microenvironnement créé par les radeaux lipidiques permet aussi l'association de plusieurs récepteurs dont les récepteurs d'immunoglobulines (Sheets *et al.*, 1999), le récepteur de l'EGF (REGF) (Vaughn *et al.*, 1999) ou encore le récepteur à l'insuline (Mastick *et al.*, 1995). La palmitoylation d'une protéine (*Hedgehog* par exemple) augmente son affinité pour les radeaux lipidiques, mais ce n'est pas une modification suffisante pour que la protéine en fasse partie (Simons et Ikonen, 1997). Comme nous le verrons dans une section ultérieure, est aussi associée aux microdomaines lipidiques une multitude de protéines participant à des voies d'internalisation particulières.

L'emplacement des radeaux lipidiques diffère d'un type cellulaire à l'autre, mais dans les cellules polarisées, les radeaux lipidiques se retrouvent principalement dans la portion apicale de la membrane alors que très peu sont localisés dans la portion basolatérale (Simons et Ikonen, 1997). L'assemblage de ces domaines organisés et des protéines qui y sont associées ayant lieu dans l'appareil de Golgi, on retrouve aussi les radeaux lipidiques dans les compartiments de la voie de biosynthèse et dans ceux de la voie sécrétoire, notamment dans le réseau trans-golgien (van Meer, 1989) et de façon transitoire dans la membrane basolatérale.

### 1.2.2 Cavéoles

Les cavéoles sont des structures en forme de puits de 60-90 nm qui sont présentes dans la membrane plasmique (Palade, 1953; Yamada, 1955) et qui sont caractérisées par la présence de cavéoline, le premier marqueur moléculaire découvert dans les cavéoles (Rothberg *et al.*, 1992). Les cavéoles sont insolubles à 4°C dans des détergents non ioniques (Sargiacomo *et al.*, 1993), ont une grande flottabilité sur un gradient de densité (Smart *et al.*, 1995), sont riches en glycosphingolipides comme les gangliosides GM<sub>1</sub> et GM<sub>3</sub> et en cholestérol (Ortegren *et al.*, 2004). Pour toutes ces raisons, il n'est pas rare que la littérature fasse référence aux cavéoles comme à des DRM ou à des radeaux lipidiques contenant de la cavéoline. Tout comme pour les radeaux lipidiques, la privation de cholestérol (Rothberg *et al.*, 1992) ou de glycosphingolipides (Cheng *et al.*, 2006) défait l'intégrité structurale des cavéoles et inhibe l'endocytose qui leur est associée.

Il existe trois isoformes de la cavéoline: Cav-1, Cav-2 et Cav-3. L'inhibition de la synthèse de Cav-1 et de Cav-3 cause la perte des cavéoles à la membrane (Drab *et al.*, 2001; Galbiati *et al.*, 2001) alors que la formation de cavéoles peut se faire en absence de Cav-2 *in vivo* (Razani *et al.*, 2002). On retrouve principalement Cav-3 dans les cellules des muscles squelettiques (Tang *et al.*, 1996) alors que Cav-1 peut être trouvée dans plusieurs cellules telles les cellules endothéliales (Peters *et al.*, 1985), les adipocytes, les pneumocytes et dans les fibroblastes (Rothberg *et al.*, 1992). L'ancrage de la Cav-1 à la membrane est permis par une région contenant des résidus hydrophobes pouvant lier deux molécules de cholestérol membranaire (Murata *et al.*, 1995) et par des résidus cystéine palmitoylés dans la portion C-terminale (Dietzen *et al.*, 1995). La Cav-1 est une protéine entièrement intramembranaire à l'exception de ses deux extrémités (N- et C-terminales) qui se retrouvent du côté cytosolique de la membrane.

### 1.2.3 Les domaines enrichis en tétraspanine et ceux contenant de la flotilline

Les tétraspanines sont des protéines contenant quatre domaines transmembranaires et sont présentes en grandes quantités dans presque tous les types cellulaires. Leur principale caractéristique commune réside dans leur habileté à se lier entre-elles et avec certains récepteurs transmembranaires pour former des microdomaines distincts: les domaines enrichis en tétraspanines (*tetraspanin enriched microdomains* ou TEM). Des études menées par microscopie électronique (Nydegger *et al.*, 2006; Espenel *et al.*, 2008) ont montré que les TEM occupent en moyenne une superficie individuelle allant de 200 à 400 nm<sup>2</sup>. Tout comme les autres types de radeaux lipidiques mentionnés jusqu'ici, les TEM sont riches en cholestérol et glycosphingolipides et la plupart des tétraspanines s'y associent en raison de leur forte palmitoylation (Berditchevski *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). D'un point de vue fonctionnel, les TEM sont notamment impliqués dans la signalisation conduisant à l'adhésion cellulaire via l'interaction des tétraspanines avec les intégrines (revu par Hemler, 2005). La colocalisation de la tétraspanine CD9 avec le *cluster of differentiation-36* (CD36), un membre de la famille des récepteurs *scavenger* de classe B, a été rapportée dans les plaquettes sanguines (Miao *et al.*, 2001). Conséquemment, il est possible, étant donné la palmitoylation du SR-BI, que ce dernier soit aussi colocalisé avec CD9.

Les flotillines (-1 et -2) sont des protéines membranaires que l'on retrouve sous forme d'oligomères dans des domaines distincts des cavéoles (Glebov *et al.*, 2006). À la manière de ces dernières, les flotillines induisent la formation de courbures dans la membrane et peuvent provoquer le bourgeonnement, donc l'endocytose (Frick *et al.*, 2007). À ce jour, nous n'avons pas d'information concernant une éventuelle association de SR-BI avec ces protéines.

## 1.3 Le trafic cellulaire

Puisque le transport vésiculaire implique une multitude de compartiments en mouvement et fusionnant les uns avec les autres, il n'est pas toujours évident d'arriver à définir avec précision les caractéristiques propres à chacun d'entre eux. Ainsi, deux modèles ont émergé de façon à les différencier: un modèle fonctionnel selon lequel les organelles sont de composition moléculaire stable et sont reliées par des vésicules assurant le transport entre celles-ci; et un modèle selon lequel les organelles et vésicules subissent un processus de maturation (Rink et al., 2005) durant lequel leur composition est graduellement modifiée, leur conférant ainsi de nouvelles fonctions. Nous adopterons ici une nomenclature traditionnelle reflétant le modèle fonctionnel pour désigner les compartiments du trafic cellulaire et donnerons les marqueurs qui leur sont associés. Parmi ces marqueurs, la plupart sont des protéines de la famille Rab (Ras-like in rat brain) (Darchen et al., 1990), des protéines à action GTPasique de la superfamille p21 ras, qui sont des joueurs importants de la machinerie cellulaire à l'origine du transport vésiculaire et de la dynamique des organelles (revu par Martinez et Goud, 1998).

### 1.3.1 Vésicules, compartiments et marqueurs

Les endosomes précoces (EE) sont des vésicules résultant de la fusion des vésicules ou compartiments primaires de l'endocytose. Ils sont caractérisés par la présence dans leur membrane de protéines comme EEA1 (*early endosome antigen 1*) ou de la petite protéine à action GTPasique, Rab5, que l'on trouve aussi localisée à la membrane plasmique et dans les puits tapissés de clathrine. Rab5 assure le transport des vésicules endocytaires vers les endosomes précoces ainsi que leur fusion (Chavrier *et al.*, 1990 a; Gorvel *et al.*, 1991). Le transport de la membrane vers les EE est dépendant des filaments d'actine et est assuré par un moteur moléculaire: la myosine de classe VI (Aschenbrenner *et al.*, 2004). Les endosomes précoces constituent un premier compartiment de triage de la voie endocytaire. On y retrouve aussi la protéine Rab4, laquelle s'associe à des vésicules de recyclage rapide des molécules

internalisées (les récepteurs notamment) vers la membrane plasmique (van der Sluijs *et al.*, 1992).

Les cargos (protéines de la membrane vésiculaire ainsi que les récepteurs et leurs ligands) peuvent aussi être transportés des endosomes précoces aux endosomes tardifs (LE) par des vésicules de transport nommées MVB (*multivesicular bodies*) ou encore vers les endosomes de triage périnucléaires (ERC: *endosomal recycling compartment*). Les MVB, dont la morphologie est le résultat de la fusion de plusieurs petites vésicules, sont marquées par la présence de Rab7 tout comme les LE (Papini *et al.*, 1997). Les molécules destinées à être dégradées sont ensuite transportées du LE vers les lysosomes, siège de l'hydrolyse, par des vésicules contenant, elles aussi, Rab7 (Chavrier *et al.*, 1990 a). Les molécules destinées à être recyclées, elles, voyagent vers l'ERC qui est un compartiment périnucléaire à l'aspect tubulo-vésiculaire à partir duquel bourgeonnent des vésicules contenant Rab11 (Ullrich *et al.*, 1996) à destination de la membrane et qui permettent le recyclage lent de certains récepteurs, ou à destination du réseau trans-golgien (Urbé *et al.*, 1993) où les molécules pourront être modifiées (Snider et Rogers, 1985) en attente d'être resécrétées ou menées vers la membrane.

En plus des compartiments de trafic cellulaire plus traditionnels mentionnés plus haut, plusieurs cellules polarisées comme les cellules WIF-B (lignée hybride d'un hépatocyte de rat et d'un fibroblaste humain différencié) ou la lignée HepG2 (hépatome humain dont le degré de polarisation est beaucoup moindre) disposent de compartiments sous-apicaux (SAC) servant de dernier compartiment avant la sécrétion des molécules subissant la transcytose (Ihrke *et al.*, 1998) ainsi que de compartiments sous-apicaux de recyclage (ARC). Ainsi le groupe de van Ijzendoorn (Hoekstra *et al.*, 1999) a identifié un SAC dans les cellules HepG2. Les cellules polarisées MDCK (*Madin Darby canine kidney*) possèdent un ARC permettant de réguler la localisation et le recyclage des protéines apicales qui est marqué par la présence de la protéine Rab11a (Wang *et al.*, 2000).

Pour que les cellules puissent maintenir leur homéostasie et pour qu'elles remplissent leurs fonctions, une multitude de mécanismes leur permet d'obtenir du milieu les éléments

essentiels et de les internaliser. Une certaine portion de ces éléments peut être acquise par diffusion à travers la membrane semi-perméable suivant un gradient de concentration, c'est le cas des gaz comme l'oxygène et de certaines molécules polaires comme l'éthanol ou l'eau. Comme la membrane est imperméable à la plupart des ions et des petites molécules polaires non chargées comme le glucose, ces derniers la traversent grâce à des protéines membranaires formant des canaux ou à des pompes qui hydrolysent l'ATP pour contrer le gradient de concentration. Ces deux mécanismes correspondent respectivement à la diffusion facilitée et au transport actif. La diffusion facilitée du glucose, par exemple, est permise par des uniporteurs de la famille GLUT qui possèdent 12 segments transmembranaires et dont au moins un des multiples isoformes est exprimé dans chacun des tissus (revu par Mueckler, 1994). La diffusion à travers la membrane plasmique ne permet cependant pas à la cellule de destiner les particules incorporées à partir du milieu à un compartiment particulier. C'est pourquoi les cellules disposent de mécanismes de bourgeonnement de la membrane permettant la formation de vésicules qui acheminent de façon précise les molécules internalisées.

## 1.4 Les voies d'entrée dans la cellule

### 1.4.1 Phagocytose

Un de ces mécanismes est la phagocytose caractérisée par l'internalisation de grosses particules ( $>0,5 \mu\text{m}$ ). Il s'agit d'un mécanisme principalement utilisé par les neutrophiles et les macrophages permettant l'internalisation de microorganismes envahisseurs et des corps apoptotiques. Ce mécanisme résulte de la formation par remodelage de la membrane d'une vésicule de grande taille suite à la liaison des particules à des récepteurs membranaires. Des études montrent que cette vésicule formée, le phagosome, subit un processus de maturation en fusionnant avec les organelles cellulaires comme les lysosomes formant un phagolysosome (Niedergang et Chavrier, 2004). On sait maintenant que les microdomaines lipidiques de la membrane pourraient jouer un rôle d'importance dans la signalisation et la formation du phagosome: notamment lors de l'internalisation de particules couvertes

d'immunoglobulines G (IgG) reconnues par les récepteurs Fc $\gamma$  (Kono *et al.*, 2002). Des études ont en effet montré que la privation de cholestérol à l'aide de statines et de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine inhibait la signalisation médiée par les récepteurs Fc et la phagocytose (Hillyard *et al.*, 2004; Loike *et al.*, 2004). Cependant, d'autres études n'ont pu démontrer le même effet (Gatfield et Pieters, 2000), ce qui ne permet pas de conclure que les radeaux lipidiques soient essentiels à la formation du phagosome.

#### 1.4.2 Endocytose dépendante de la clathrine

Classiquement, deux modèles d'importance sont étudiés lorsqu'il est question d'endocytose dépendante de la clathrine: l'endocytose du récepteur de la transferrine (rTf) et l'endocytose du récepteur de LDL (rLDL).

Dans le plasma, le fer est majoritairement transporté par la transferrine (Tfn), une glycoprotéine de 80 kDa capable de lier deux atomes de fer (Fe<sup>3+</sup>) (Holmberg et Laurel, 1947; Laurel et Ingelman, 1947), qui est principalement sécrétée par les hépatocytes. Les cellules en contact direct avec la circulation disposent de récepteurs à la transferrine (rTf), une protéine membranaire intégrale homodimérique glycosylée de 95 kDa (McClelland *et al.*, 1984), dont la régulation s'effectue principalement au niveau transcriptionnel en réponse à des facteurs mitogènes (Tsuji *et al.*, 1991). La structure du rTf ainsi que de ses différents domaines est très bien connue (revu dans Aisen, 2004). La liaison de la transferrine à l'extrémité carboxyterminale du rTf conduit à son internalisation dans un puits tapissé de clathrine par un mécanisme essentiellement identique à celui employé par le rLDL. Nous décrirons ce dernier bientôt. Son recyclage constitue cependant un mécanisme particulier qui a été décrit par l'équipe d'Harvey Lodish, il y a maintenant plusieurs années (Dautry-Varsat *et al.*, 1983) et qui mérite d'être expliqué ici. Ainsi, à pH neutre, le rTf ne peut lier la transferrine que si elle est chargée avec deux atomes de fer (ferrotransferrine). Cette liaison provoque l'internalisation du complexe rTf / ferrotransferrine puis la fusion du compartiment d'endocytose avec un compartiment modérément acide (pH 5,4). À ce pH, la transferrine perd son affinité pour le fer, mais le complexe rTf / transferrine est conservé. Le

récepteur et la transferrine sont ensuite recyclés vers la membrane, où le pH neutre provoque leur dissociation, remettant en circulation la transferrine non liée au fer.

En 1999, un second récepteur de la transferrine (rTf2) a aussi été caractérisé (Kawabata *et al.*, 1999). Son rôle dans le métabolisme du fer n'est pas encore défini de façon aussi claire que celui de rTf1, mais fait, depuis sa découverte, l'objet d'intenses recherches (revu dans Anderson *et al.*, 2007). Une particularité de l'endocytose du rTf1 est qu'elle est modérée par le produit du gène *HFE* (High Fe) (Roy *et al.*, 1999), une protéine semblable au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, dont la mutation Cys260Tyr empêche sa translocation à la membrane où il interagit normalement avec rTf1. L'absence à la membrane de ce modérateur conduit à l'hémochromatose, une maladie génétique fréquente caractérisée par l'accumulation toxique, voire létale, de fer dans l'ensemble des tissus. Récemment, on a découvert d'autres mutations sur le produit du gène HFE qui empêcheraient son interaction avec rTf2 et conduiraient aussi à l'hémochromatose (Chen *et al.*, 2007).

Afin d'expliquer le mécanisme d'endocytose dépendante de la clathrine, nous nous pencherons désormais sur l'endocytose du rLDL. Le tout débute par la liaison de la LDL au rLDL présent dans les puits tapissés de clathrine. Une fois la lipoprotéine liée au récepteur, plusieurs molécules adaptatrices et accessoires sont recrutées à la membrane forçant ainsi la polymérisation des unités de clathrine. Le bourgeonnement d'une vésicule couverte de clathrine contenant le complexe LDL / rLDL est alors permis par la dynamine qui provoque la scission de la vésicule à partir de la membrane. Le manteau de clathrine est ensuite enlevé alors que la vésicule s'acidifie, ce qui permet au complexe LDL / rLDL de se dissocier. Le rLDL est ensuite recyclé à la membrane dans une vésicule alors que le compartiment contenant la LDL internalisée fusionne avec le lysosome permettant son hydrolyse complète en acides gras, cholestérol libre, glycérol et acides aminés.

Les protéines adaptatrices AP font partie d'une famille de protéines (AP1-AP4) impliquées dans l'endocytose médiée par un récepteur, l'assemblage du manteau de clathrine, le bourgeonnement de la vésicule, la perte du manteau de clathrine et dans l'interaction entre la

vésicule et les microfilaments d'actine. Elles sont tétramériques comprenant une grande ( $\beta$ ), une moyenne ( $\mu$ ), une petite ( $\sigma$ ) sous-unité et une seconde sous-unité de grande taille ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$  ou  $\delta$  pour AP1, AP2, AP3 et AP4 respectivement) (revu dans Jarouse et Kelly, 2000). AP2 sert de protéine adaptatrice entre le rLDL et les unités de clathrine, comme le montre la diminution d'un ordre de 12 fois du nombre de puits tapissés de clathrine formés dans des cellules traitées avec un ARN interférant ciblant la sous-unité  $\mu$ 2 de cette protéine (Motley *et al.*, 2003). En étant recrutées à la membrane, les AP-2 permettent aux triskelions de clathrine de se polymériser et de former un treillis qui donnera naissance au puits tapissé de clathrine (revu dans Brodsky *et al.*, 2001). Pour se faire, il est essentiel que Eps15 se lie à AP-2 (Benmerah *et al.*, 1998). Les hépatocytes se distinguent des autres cellules en ce qu'elles n'expriment pas la sous-unité spécifique des cellules épithéliales ( $\mu$ 1B) pour former le complexe AP-1 / clathrine (Ohno *et al.*, 1999). Dans les cellules épithéliales,  $\mu$ 1B est essentielle pour décoder les signaux d'adressage à la membrane basolatérale (TyrXX $\phi$ ) du rLDL à partir du réseau trans-golgien (Fölsch *et al.*, 1999).

La dynamine est une protéine (100 kDa) à action GTPasique essentielle lors des premières étapes de l'endocytose (Kosaka et Ikeda, 1983). Elle permet le bourgeonnement du puits tapissé de clathrine (Damke *et al.*, 1994) en interagissant à la fois avec la clathrine, les microtubules (Herskovits *et al.*, 1993) et elle-même pour former un anneau contractile (Hinshaw et Schmid, 2002). À elle seule, la dynamine ne peut remplir toutes ces tâches, d'où l'importance des protéines adaptatrices. La dynamine contient aussi un domaine d'homologie à la pleckstrine (première protéine où ce domaine a été identifié, la pleckstrine est le principal substrat de la protéine kinase C dans les plaquettes sanguines) lui permettant d'interagir avec le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (Mayer *et al.*, 1993), une molécule importante de la signalisation cellulaire, responsable de sa localisation sur la face cytosolique de la membrane plasmique. Le transport de la vésicule couverte de clathrine se fait ensuite suivant les filaments d'actine grâce à un moteur moléculaire: la myosine de classe VI (Aschenbrenner *et al.*, 2004).

Classiquement, il est possible d'inhiber l'endocytose dépendante de la clathrine par différents moyens. Le traitement de cellules dans un milieu hypertonique (obtenu avec du sucrose) inhibe la formation des puits de clathrine (Heuser et Anderson, 1989). Le chlorure d'ammonium inhibe le recyclage à la surface du rLDL et provoque une augmentation de sa localisation dans des compartiments intracellulaires et favorise sa dégradation (Grant *et al.*, 1990). Un traitement privant les cellules d'énergie (azoture de sodium et 2-d-désoxyglucose) inhibe aussi l'endocytose dépendante de la clathrine. Les filaments d'actine étant essentiels pour l'endocytose, le traitement de cellules avec des drogues perturbant la polymérisation de l'actine comme la cytochalasine D résulte en une inhibition de ce mécanisme (Lamaze *et al.*, 1997). La privation de potassium intracellulaire suivant un choc hypoosmotique est aussi un moyen efficace d'inhiber l'internalisation de récepteurs suivant une voie dépendante de la clathrine (Larkin *et al.*, 1983). La privation aiguë de cholestérol à l'aide de cyclodextrine inhibe aussi le bourgeonnement des puits tapissés de clathrine (Subtil *et al.*, 1999).

#### 1.4.3 Endocytose indépendante de la clathrine

L'endocytose indépendante de la clathrine constitue un phénomène qui ne fait l'objet d'intenses recherches que depuis peu, même si plusieurs indices laissent entrevoir son existence depuis déjà longtemps. En effet, des études ultrastructurales avaient déjà démontré l'existence d'invaginations de la membrane dépourvues de manteau de clathrine dans des cellules épithéliales (Huet *et al.*, 1980) et dans des fibroblastes (Hansen *et al.*, 1991). De plus, malgré l'utilisation d'inhibiteurs classiques de l'endocytose dépendante de la clathrine, il a été démontré que plusieurs molécules continuaient d'être internalisées (Sandvig et Van Deurs, 1994). Les voies endocytaires indépendantes de la clathrine sont divisées en fonction des protéines qui en régulent l'activité. Nous discuterons ici de : 1) l'endocytose par les cavéoles; 2) l'endocytose régulée par Cdc42 et Arf1; 3) l'endocytose régulée par RhoA; 4) l'endocytose régulée par Arf6. L'endocytose régulée par la flotilline ne sera pas abordée, faute de détails disponibles. Comme nous le verrons, certaines de ces voies sont constitutives et d'autres nécessitent un signal pour être activées, mais toutes sont associées à des radeaux lipidiques.

#### 1.4.3.1 Endocytose régulée par les cavéoles

Les cavéoles sont impliquées dans l'internalisation de plusieurs molécules qui en stimulent l'endocytose. Parmi celles-ci, on compte certains virus comme SV40 (Pelkmans *et al.*, 2001), certaines toxines comme la toxine du cholera (Orlandi et Fishman, 1998), des bactéries (Shin *et al.*, 2000), mais aussi les sphingolipides (Puri *et al.*, 2001) et le cholestérol (Sharma *et al.*, 2004). Le cavéosome ainsi formé bourgeonne alors de la membrane par un mécanisme impliquant la dynamine (Oh *et al.*, 1998; Henley *et al.*, 1998) et les filaments d'actine (Pelkmans *et al.*, 2002) et fusionne avec les EE. Le cavéosome peut ensuite être recyclé vers la membrane (Pelkmans *et al.*, 2004). Des études rapportent que l'albumine est internalisée par un mécanisme dépendant des cavéoles (Minshall *et al.*, 2002), mais cela dépendrait du type cellulaire; l'albumine pourrait aussi être internalisée (dans les cellules CHO par exemple) grâce à un mécanisme régulé par RhoA (Cheng *et al.*, 2006), lequel sera décrit plus bas. On rapporte aussi que les cavéoles sont associées à la transcytose à travers les cellules endothéliales de l'albumine et de l'orosomucoïde, une protéine de phase aiguë permettant le transport de composés lipophiles neutres ou basiques (revu dans Tuma et Hubbard, 2003). Le **Tableau I** résume les effets de différents traitements sur l'endocytose par les cavéoles et les principales caractéristiques de cette voie.

#### 1.4.3.2 Endocytose régulée par RhoA

Les GTPases de la famille de Rho sont des protéines de faible poids moléculaire ( $\approx 21$  kDa) impliquées dans le contrôle du trafic cellulaire, l'exocytose, la dégranulation des mastocytes, la migration des cellules neuronales, l'établissement de la polarité membranaire et la progression du cycle cellulaire (revu par Symons et Rusk, 2003). Leur implication dans les

Tableau I: Synthèse des caractéristiques propres à chacune des voies endocytaires.

a) Caractéristiques morphologiques des vésicules associées à ces différents mécanismes et marqueurs connus de ces voies.

Mécanismes d'endocytose					
	Dépendant de la clathrine	Cavéolaire	Régulé par RhoA	Régulé par Cdc42	Régulé par Arf6
Cargo ou marqueur	Tfn LDL	Analogues de GSL Albumine SV40	IL-2R $\beta$ Récepteur $\gamma$	GPI-AP Marqueurs de la phase fluide Toxine B du choléra	CMH-I E-cadhérine
Machinerie cellulaire associée	Dynamine AP2 AP-180 Clathrine	Dynamine Cavéoline-1 Src Rab5	Dynamine RhoA	Cdc42 Rab5 PI3K EEA1	Arf6 Rab11 Rab22 PI3K
Type de vésicule primaire	Vésicule tapissée de clathrine	Vésicule striée contenant de la cavéoline	Vésicule sans manteau	Vésicule tubulaire sans dynamine ni clathrine (CLIC)	Non identifié
Premier compartiment rejoint	Endosome précoce (EE)	Cavéosome ou EE	EE	Compartiment acide enrichi en protéines à ancrage de GPI (GEEC)	Compartiment précoce de recyclage tubulaire

mécanismes d'endocytose est une découverte assez récente bien que déjà en 1992 le groupe de A. Hall (Ridley *et al.*, 1992) démontrait l'implication de la protéine Rac dans la stimulation de la macropinocytose. Ces petites GTPases passent alternativement d'un état actif (liées au GTP) à un état inactif (liées au GDP). Le cycle d'activation et d'inactivation des GTPases est contrôlé par trois types de protéines régulatrices: les GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*) qui catalysent l'échange de GDP pour une molécule de GTP en stabilisant la protéine et la rendant active; les GAP (*GTPase-activating protein*) qui stimulent l'échange du GTP pour du GDP, l'inactivant ainsi et les GDI (*Guanine nucleotide dissociation inhibitor*) qui lient le complexe Rho / GDP et maintiennent la GTPase dans une conformation inactive tout en masquant son domaine d'homologie à la pleckstrine (Symons

b) Effet de différents traitements ou inhibiteurs sur le fonctionnement de ces voies.

Mécanismes d'endocytose					
Inhibiteurs ou protéines à effet dominant négatif (DN)	Dépendant de la clathrine	Cavéolaire	Régulé par RhoA	Régulé par Cdc42	Régulé par Arf6
DN-Dyn2	X	X	X	- / ↑	-
DN-Arf6	ND	ND	ND	-	X <sup>(a)</sup>
Déplétion en cholestérol (Fillipine; Mβ-CD)	- / X	X	X	-/X	X
Dépolymérisation des filaments d'actine (Cytochalasine D)	X	X	X	X	X <sup>(a)</sup>
Inhibiteurs de tyrosine kinases (Génistéine)	-	X	- / X	X	ND
Inhibiteurs de Src kinases (PP2)	ND	X	-	-	ND
DN-Cav-1; Cav-1 KD	-	X	-	-	ND
Inhibiteurs de Rho GTPases (CDTxB)	-	-	X	X	ND
DN-RhoA	-	-	X	-	ND
DN-Cdc42	-	-	-	X	ND
Inhibiteurs de l'endocytose dépendante de la clathrine (DN-AP-180; Chlorpromazine)	X	-	-	-	ND
Déplétion en sphingolipides	-	X	X	X	ND
Déplétion en glycosphingolipides	-	X	-	-	ND

X: Inhibe le mécanisme; -: N'affecte pas le mécanisme; ↑: Augmente l'activité; ND: Effet non déterminé; (a): Inhibe le recyclage; Adapté de Mayor et Pagano, 2007 et Cheng *et al.*, 2006.

et Settleman, 2000). Les GEF de RhoA et de Cdc42 appartiennent à la famille des GEF Dbl (revu dans Rossman *et al.*, 2005) et sont particulièrement intéressantes en ce qu'elles disposent d'un domaine d'homologie à la pleckstrine leur permettant de s'ancrer à la membrane et d'interagir avec les phosphoinositides-phosphates (Snyder *et al.*, 2001).

La première étude montrant que RhoA était impliquée dans l'endocytose d'un cargo spécifique a été effectuée par C. Lamaze (2001) qui étudiait alors la voie d'internalisation du récepteur de l'interleukine-2. En employant des cellules exprimant un dominant négatif de Eps15, une protéine dont la liaison à AP-2 est essentielle au mécanisme d'endocytose dépendante de la clathrine (Benmerah *et al.*, 1998), il a démontré que la chaîne  $\beta$  du IL-2R continuait d'être internalisée et qu'elle était localisée dans des DRM suite à la liaison du ligand. Il fut démontré dans la même étude que ce mécanisme d'endocytose était dépendant de la dynamine et de RhoA puisque ce dernier était inhibé par l'expression de protéines à effet dominant négatif de ces deux GTPases. La vésicule endocyttaire résultant de l'endocytose dépendante de RhoA fusionne avec les endosomes précoces (Leung *et al.*, 1999). La dépolymérisation des filaments d'actine à l'aide de traitement à la cytochalasine D inhibe ce mécanisme d'endocytose (Sauvonnet *et al.*, 2005). Étonnamment, l'expression d'un mutant constitutivement actif de RhoA inhibe l'endocytose dépendante de la clathrine dans les cellules non polarisées (Lamaze *et al.*, 1996), mais la stimule dans les cellules MDCK (Leung *et al.*, 1999). Plus récemment, Grassart *et al.* (2008) ont montré que l'internalisation via cette voie de la chaîne  $\beta$  du IL-2R nécessitait aussi l'activité de Rac1 et serait régulée par les protéines Pak1 et Pak2. Le **Tableau I**: résume les effets de différents traitements sur l'endocytose par RhoA et les principales caractéristiques de cette voie.

#### 1.4.3.3 Endocytose régulée par Cdc42/Arp1

Un mécanisme d'endocytose indépendant de la clathrine et de la dynamine a d'abord été identifié dans des cellules HeLa exprimant un mutant à effet dominant négatif de la dynamine-1 (Damke *et al.*, 1994). Non seulement l'expression de ce mutant bloquait-elle l'endocytose, mais elle stimulait l'internalisation de marqueurs de la phase fluide (la HRP; *Horseradish peroxidase*) et donc la pinocytose. Cette voie d'internalisation constitutive a été identifiée grâce à l'emploi d'un inhibiteur de GTPases comme la toxine B de *Clostridium difficile* (Fivaz *et al.*, 2002) et de protéines à effet dominant négatif de Cdc42 (Sabharanjak *et al.*, 2002; Guha *et al.*, 2003). Ces inhibiteurs provoquaient en effet une inhibition de l'internalisation des protéines résidentes des radeaux lipidiques possédant une ancre de

glycosylphosphatidylinositol (GPI-AP) et de l'internalisation des marqueurs de la phase fluide comme le dextran. Ces études démontrent que les molécules internalisées par cette voie sont d'abord dirigées dans un compartiment modérément acide nommé GEEC (*GPI-AP enriched early endosomal compartment*) avant d'être menées vers un compartiment associé à Rab7 qui est, soit un endosome tardif, soit un ERC. Les filaments d'actine sont essentiels au bon fonctionnement du mécanisme d'internalisation régulé par cdc42 (Gauthier *et al.*, 2004). Le rôle d'Arf1 dans la régulation de ce type d'endocytose ne fait cependant pas l'unanimité. Arf1 permettrait d'induire une courbure négative dans la membrane plasmique en s'y insérant (revu par Doherty et McMahon, 2009), mais ne serait pas essentielle selon le modèle cellulaire et le ligand à internaliser. Le **Tableau I**: résume les effets de différents traitements sur l'endocytose régulée par Cdc42 et les principales caractéristiques de cette voie.

#### 1.4.3.4 Endocytose régulée par Arf6

Le rôle de la GTPase Arf6 (*ADP-ribosylation factor*) dans l'endocytose indépendante de la dynamine et de la clathrine de plusieurs molécules comme le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI), l'intégrine  $\beta 1$  et certaines GPI-AP n'est pas encore très bien défini. On sait cependant que la protéine Arf6 est impliquée dans le remodelage de l'actine et l'interaction avec le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP<sub>2</sub>) (revu dans D'Sousa-Schorey et Chavrier, 2006). Cependant, même l'expression d'un dominant négatif de Arf6 n'a pu inhiber l'internalisation des protéines mentionnées ci-haut (Brown *et al.*, 2001). Le **Tableau I**: résume les effets de différents traitements sur l'endocytose régulée par Arf6 et les principales caractéristiques de cette voie.

#### 1.4.4 Transcytose et polarité

Alors que certaines molécules sont internalisées et demeurent dans la cellule, d'autres empruntent des compartiments particuliers leur permettant de traverser la cellule. Ce phénomène, que l'on nomme transcytose, se produit dans les entérocytes qui disposent de

récepteurs d'immunoglobuline A (IgA) (Brown *et al.*, 1976), dans les cellules de l'endothélium cérébral qui disposent de rLDL (Dehouck *et al.*, 1997) ainsi que dans plusieurs autres types cellulaires (revu par Tuma et Hubbard, 2003). En somme, la transcytose a lieu dans les cellules dites polarisées, c'est-à-dire qui possèdent un domaine membranaire basolatéral et un domaine apical; chacun ayant des fonctions et des activités différentes qui reposent sur la présence de protéines et de lipides distincts. Chez des cellules cultivées dans un milieu privé de cholestérol ou de glycosphingolipides, bien que l'endocytose à partir du domaine basolatéral soit toujours permise, le processus de transcytose des protéines apicales est bloqué dans les EE (Nyasae *et al.*, 2003). De plus, les protéines destinées au domaine apical sont, dans les cellules non polarisées (qui ont perdu leur polarité ou qui ne l'ont pas encore acquise), constamment échangées ( $t_{1/2} \approx 4$  min) entre le domaine basolatéral et un compartiment intracellulaire «apical», et cela dû à une absence de rétention à la membrane apicale (Tuma *et al.*, 2002).

Les cellules hépatiques sont, elles-aussi, hautement polarisées et maintiennent une distribution protéique et lipidique distincte entre ce que l'on nomme la portion sinusoidale (basolatérale) et la portion canaliculaire (apicale) de leur membrane plasmique. Le maintien et la génération de cette polarité (revu dans Wang et Boyer, 2004) sont essentiels aux fonctions de l'hépatocyte et jouent un rôle important dans le métabolisme du cholestérol. Ainsi, les récepteurs de lipoprotéines, comme le rLDL et le SR-BI, sont principalement localisés à la membrane sinusoidale qui donne sur la circulation sanguine, ce qui leur permet d'entrer en contact avec les lipoprotéines présentes dans le plasma. Le SR-BI se retrouve aussi, suite à sa transcytose et son passage dans les SAC/ARC, dans la membrane du canalicule biliaire là où le cholestérol provenant de l'hydrolyse des EC-HDL et les sels biliaires peuvent subir l'efflux (revu Par Silver, 2004).

## CHAPITRE II: PROBLÉMATIQUE

Les maladies cardiovasculaires constituent encore aujourd'hui la première cause de mortalité en Amérique du Nord. Il est connu que le risque de développer ces maladies est directement corrélé avec la concentration plasmatique de cholestérol associé aux LDL (Gordon *et al.*, 1981) et inversement à la concentration de cholestérol associé aux HDL (Gordon et Rifkind, 1989). Ces deux classes de lipoprotéines, les principales chez l'humain, sont toutes deux des ligands du SR-BI, lequel joue un rôle primordial dans le métabolisme du cholestérol. En effet, le SR-BI est responsable de la dernière étape du transport inverse du cholestérol (TIC) (revu par Fielding et Fielding, 1995). Le TIC consiste en le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, assurant ainsi la clairance du cholestérol sous forme d'acides biliaires et c'est le SR-BI qui est responsable du transfert des esters de cholestérol des lipoprotéines vers les hépatocytes. Cette étape de transfert, du fait qu'elle n'implique pas de dégradation dans un compartiment cellulaire acide de la partie protéique de la lipoprotéine, se nomme captation sélective. Ainsi la lipoprotéine n'est pas conduite vers un compartiment acide pour y être dégradée, mais est plutôt « vidée » de ses esters de cholestérol (Glass *et al.*, 1983; Stein *et al.*, 1983), lesquels sont hydrolysés par la suite dans un compartiment acide. La captation sélective est donc mise en évidence par la différence entre l'internalisation de la fraction lipidique et l'internalisation de la fraction protéique. Il a été démontré que la captation sélective des esters de cholestérol n'était pas effectuée qu'à partir des HDL, mais qu'elle pouvait aussi se faire à partir d'autres lipoprotéines, notamment les IDL et les LDL (Brissette et Falstrault, 1994; Brissette *et al.*, 1996), et de lipoprotéines modifiées comme les LDL oxydées (oxLDL) ou acétylées (AcLDL) (Fluiter et Van Berkel, 1997; Rhoads *et al.*, 1999).

Le mécanisme par lequel SR-BI effectue la captation sélective ne fait cependant pas l'unanimité (Acton *et al.*, 1996; Murao *et al.*, 1997). Ainsi, deux phénomènes peuvent être à l'origine de la captation sélective : un processus de transfert des EC à la surface des cellules (Rodriguez *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; ) après quoi la lipoprotéine se détache du récepteur; ou un processus nommé rétroendocytose (Eckhardt *et al.*, 2004; Rhoads *et al.*, 2004) par lequel la lipoprotéine est internalisée, appauvrie en EC durant son trajet à l'intérieur de la

cellule et est resécritée. Cependant, l'observation de ces mécanismes pourrait dépendre des types cellulaires étudiés ou des méthodes employées (Eckhardt *et al.*, 2004; Nieland *et al.*, 2005; Harder *et al.*, 2006). De plus, il semble de plus en plus évident que le phénomène de captation sélective diffère selon les lipoprotéines impliquées et qu'elle soit régulée différemment en fonction des apolipoprotéines présentes (Charpentier *et al.*, 2000; Huard *et al.*, 2005) ou de l'emplacement de SR-BI dans la membrane (Truong *et al.*, 2006; Rhoads *et al.*, 2004).

Dans les cellules HepG2, il a été montré que plusieurs traitements visant à modifier le contenu lipidique des radeaux lipidiques affectent le processus de captation sélective des EC, favorisant soit le transfert en provenance des HDL, soit des LDL. Il apparaît donc que le processus mené par SR-BI est en partie dépendant de sa présence dans les radeaux lipidiques (Rhoads *et al.*, 2004). À ces domaines membranaires particuliers sont aussi associées des voies d'endocytose que l'on dit indépendantes de la clathrine (revue par Mayor et Pagano, 2007) et qui font l'objet d'intenses recherches depuis les études pionnières menées par Christophe Lamaze (Lamaze *et al.*, 1996; Lamaze *et al.*, 1997). Pour ces raisons, il apparaît tout indiqué de se pencher sur la possible implication de ces voies dans le phénomène de captation sélective et ainsi parvenir à déterminer plus en profondeur le mécanisme qui en est responsable. D'autres ont déjà débuté en perturbant l'intégrité des radeaux lipidiques dans des cellules non hépatiques (CHO ou COS) sans encore s'être penché sur la captation sélective des LDL (Zhang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007).

### CHAPITRE III: HYPOTHÈSES

i) Étant donné que le mécanisme par lequel le SR-BI effectue la captation sélective ne fait pas l'unanimité (Acton *et al.*, 1996; Murao *et al.*, 1997) et qu'il semble différer d'un modèle cellulaire à l'autre (Eckhardt *et al.*, 2004; Nieland *et al.*, 2005; Harder *et al.*, 2006); il est postulé que des mécanismes d'endocytose sont responsables de l'activité du SR-BI. L'inhibition de l'endocytose dépendante de la clathrine à l'aide d'inhibiteurs comme le chlorure d'ammonium, la cytochalasine D, la chlorpromazine, la privation des cellules en énergie et le choc hypertonique couplée à des essais d'association et de liaison de lipoprotéines (LDL et HDL) devrait permettre de vérifier que l'activité de captation sélective de SR-BI peut être influencée par de tels mécanismes.

ii) Étant donné les récentes avancées dans l'étude des mécanismes d'endocytose indépendante de la clathrine (Mayor et Pagano, 2007); il est postulé que de tels mécanismes d'endocytose indépendante de la clathrine sont responsables de la captation sélective via le SR-BI dans les hépatocytes. Ces mécanismes pouvant être différenciés sur la base de leur dépendance à la dynamine ou à des GTPases, le traitement des cellules avec le dynasore (inhibiteur pharmacologique de la dynamine) ou la sous-unité B de la toxine de *C. difficile* (inhibiteur de RhoA et Cdc42) couplé à des essais d'association et de liaison de lipoprotéines (LDL et HDL) devrait permettre de caractériser davantage la ou les voies d'endocytose modulant l'activité de captation sélective du SR-BI.

iii) Étant donné que ces mécanismes sont associés à des domaines membranaires dont la composition lipidique est autrement plus organisée: les radeaux lipidiques; étant donné que des études ont rapporté une influence de la composition lipidique des ces domaines sur l'efficacité des dits mécanismes (Cheng *et al.*, 2006); et étant donné que la perturbation des radeaux lipidiques influence l'activité de captation sélective de SR-BI (Rhainds *et al.*, 2004); il est postulé que les différents traitements affectant l'endocytose ainsi que des traitements affectant la composition membranaire des cellules pourraient déplacer le SR-BI hors des radeaux lipidiques, expliquant ainsi l'inhibition de l'endocytose observée et sa perte

d'activité. Par l'ajout au milieu d'essais de molécules séquestrant ou décomposant certains lipides (fillipine, méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, SMase) ou encore en diminuant la production endogène (à l'aide d'inhibiteurs généraux et particuliers de la voie de synthèse des (glyco)sphingolipides ou du cholestérol), il sera possible de vérifier que l'activité de SR-BI est régulée par la composition lipidique de la membrane cellulaire. Le fractionnement sur un gradient de densité des protéines cellulaires suite à ces traitements devrait permettre de confirmer que la localisation membranaire du SR-BI est responsable de l'activité observée ou de son endocytose.

iv) Étant donné que plusieurs études de notre groupe démontrent une activité différentielle de SR-BI envers les LDL et les HDL (Charpentier *et al.*, 2000; Huard *et al.*, 2005; Rhainds *et al.*, 2004; Truong *et al.*, 2006); étant donné que la captation sélective de ces deux ligands via le SR-BI a été montrée comme des processus physiologiquement pertinents (Brodeur *et al.*, 2005); il est postulé que l'activité de SR-BI envers ces deux classes majeures de lipoprotéines est régulée par des effecteurs qui leur sont propres et que l'identification / caractérisation de la ou des voies d'endocytose contribuera à expliquer ces différences.

Ces quatre hypothèses permettront d'affirmer que l'activité différentielle de SR-BI envers les deux classes majeures de lipoprotéines (HDL et LDL) peut être expliquée par la localisation du SR-BI dans certains microdomaines de la membrane cellulaire, par la composition lipidique de ces microdomaines et par des mécanismes d'endocytose distincts dans un modèle représentatif de la cellule hépatique: les cellules HepG2. Ainsi, s'il est montré que les inhibiteurs classiques et particuliers de l'endocytose ont un effet sur la captation sélective, la ou les voie(s) responsable(s) pourra(ont) être caractérisée(s) davantage. S'il est montré que la perte de glycosphingolipides et de cholestérol à la membrane inhibe la captation sélective, il pourra être vérifié qu'il s'agit de la voie dépendante des cavéoles ou non selon qu'elle est aussi inhibée par l'ajout de dynasore et de PP2. Si la privation de sphingolipides en général et de cholestérol inhibe la captation sélective, l'attribution de ce mécanisme à une régulation par Cdc42 ou par RhoA pourra être confirmée par l'ajout au milieu d'essai de la sous-unité B de

la toxine de *C. difficile*. Ultimement, ces deux voies pourraient être départagées selon leur sensibilité (caractéristique de RhoA) ou non (caractéristique de Cdc42) au dynasore.

## CHAPITRE IV: MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Matériel*

La lignée d'hépatome humain HepG2 et les vecteurs contenant l'ADN complémentaire (ADNc) de la dynamine-2 WT (pcDNA3.1 (-) HA-Dyn2 WT; MBA-94), de la dynamine-2 K44A (pcDNA3.1 (-) HA-Dyn2 K44A; MBA-95) ont été obtenus de American Type Culture Collection (Manassas, MD). Le milieu essentiel minimal (MEM), le sérum de veau fœtal (SVF) et la pénicilline-streptomycine utilisés pour la culture des cellules HepG2 ainsi que le G418 sulfate ont été achetés d'Invitrogen (Burlington, Ontario). Le plasma sanguin de sujets normolipidémiques a été obtenu de Bioreclamation (Hicksville, NY). L'iode-125 ( $^{125}\text{I}$ ) (100 mCi/mmol) et le  $^3\text{H}$ -cholestérol oléate (50 mCi/mmol) pour le marquage des lipoprotéines provenaient respectivement de ICN Canada (Montréal, QC) et de GE Healthcare (Laval, QC). Les anticorps polyclonaux anti-SR-BI ont été acquis de Novus Biologicals (Littleton, CO). Les anti-IgG couplés à la peroxydase ont été obtenus de Calbiochem (La Jolla, CA). La méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (m $\beta$ -CD), la sphingomyélinase (SMase), la chlorpromazine, la cytochalasine D, le 2-D-désoxyglucose, l'azoture de sodium, l'inhibiteur sélectif des tyrosine phosphatases de la famille de Src (PP2), la génistéine, la fumonisine B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), la chloroquine, le dynasore, et le sucrose ont été achetés de Sigma-Aldrich (Mississauga, Ontario). La *N*-butyldésoxygalactonojirimycine (NB-DGJ) a été obtenue de Toronto Research Chemicals (Toronto, Ontario, Canada). La sous-unité B de la toxine de *C. difficile* a été obtenue de List Biological Laboratories Inc. (Campbell, CA). Tous les autres réactifs provenaient de Sigma-Aldrich (Mississauga, Ontario).

### *Culture cellulaire*

Les cellules HepG2 ont été mises en croissance dans un incubateur à 37° C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> auxquels étaient ajoutés 14 mL de MEM contenant 10 % de SVF, 100 unités / mL de pénicilline, 100 µg / mL de streptomycine, 4 mM de

glutamine. Le milieu de culture a été changé tous les 2-3 jours et le passage cellulaire effectué à tous les 7 jours. Les essais de captation sélective et autres expériences ont été effectués avec des cellulesensemencées de 4 à 6 jours auparavant dans des plaques de culture de 12 puits (3,8 cm<sup>2</sup>) de sorte qu'elles soient à une confluence de 80 à 90 % le jour de l'expérience. Les cellules Cav13, décrites ailleurs (Truong *et al.*, 2006), ont été maintenues dans ces mêmes conditions dans du MEM contenant 400 µg / mL de G418 sulfate.

#### *Isolement et marquage des lipoprotéines*

Les LDL (1,025 à 1,063 g / mL) et HDL<sub>3</sub> (1,125 à 1,210 g / mL) ont été isolées par ultra centrifugation différentielle selon la méthode décrite par Hatch et Lees (1968) et légèrement modifiée par Brissette et Noël (1986) à partir du plasma d'individus normolipidémiques supplémenté de 0,01 % d'éthylènediamine tétraacétate (EDTA), de 0,02 % d'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>), de 10 µM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) et de 20 mM de Trolox. La densité du plasma pour les différentes centrifugations a été ajustée par l'ajout de bromure de sodium (NaBr) et les centrifugations ont été effectuées à 16° C. L'excès de NaBr a été éliminé par dialyse contre un tampon salin (TBS) (10 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl et 0,02 % *p/v* de NaN<sub>3</sub>). La partie protéique des lipoprotéines isolées a été marquée à l'iode-125 par la méthode de McFarlane (1958) modifiée par Langer *et al.* (1972) en présence de 30 mmol (10 mmol pour les HDL<sub>3</sub>) de monochlorure d'iode (1 mCi / 2,5 mg de lipoprotéines) dans un tampon de 0,5 M de glycine-NaOH, pH 10. L'iode libre a été éliminé par filtration sur gel de Séphadex G-25 suivie d'une dialyse contre un tampon TBS. L'activité spécifique des lipoprotéines ainsi marquées a été mesurée au compteur gamma (Compteur Cobra II). Le marquage des EC contenus dans les lipoprotéines a été effectué selon la méthode décrite par Roberts *et al.* (1985) avec du <sup>3</sup>H-cholestéryl oléate (EC). Pour ce faire, 25 µCi de <sup>3</sup>H-EC ont été évaporés sous azote et resuspendus dans 250 µL d'acétone. À ce volume ont été ajoutés 3 mL de sérum déficient en lipoprotéine contenant de la CETP (*cholesteryl ester transfer protein*) et l'acétone a ensuite été évaporée sous azote. Les lipoprotéines (1 mg / mL) ont été incubées dans ce sérum pendant 30 min à 4° C pour ensuite

être isolées par centrifugation tel que décrit plus haut. L'activité spécifique des lipoprotéines marquées aux  $^3\text{H}$ -CE a été mesurée au compteur bêta (Tricarb, Perkin-Elmer).

#### *Essais d'association des lipoprotéines*

Les essais d'association ont été effectués avec des cellules HepG2 ou Cav13 ensemencées sur des plaques de 12 puits ( $3,8 \text{ cm}^2$  / puits) à 80-90 % de confluence avec ou sans les différents traitements prévus. Pour les contrôles, les cellules ont d'abord été lavées à deux reprises avec 1 mL de tampon phosphate salin (PBS: 20 mM de phosphate, pH 7,4, 0,02 % (p/v) de KCl et 0,08 % (p/v) de NaCl) avant d'être incubées en présence de lipoprotéines (HDL ou LDL (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )) marquées à l'iode-125 ou aux  $^3\text{H}$ -EC dans 125  $\mu\text{L}$  de MEM contenant 2 % (p/v) de BSA à pH 7,4 (volume final de 250  $\mu\text{L}$ ) pendant 4 heures à 37 °C. L'association non spécifique a été déterminée par l'ajout de 1,5 mg / mL de lipoprotéines non marquées. Le milieu d'incubation (pour les cellules incubées avec des lipoprotéines marquées à l'iode-125) a ensuite été prélevé en vue des tests de dégradation. Les cellules ont ensuite été lavées avec 0,25 mL de PBS contenant 0,2 % (p/v) de BSA (lui aussi récupéré pour les tests de dégradation) et 1 mL de PBS. Les cellules ont été solubilisées dans 1,5 mL d'hydroxyde de sodium (0,1 N). La radioactivité associée à l'iode-125 (association protéique) a été déterminée au compteur gamma (Compteur Cobra II, Packard) et l'activité du tritium (association EC) mesurée au compteur bêta (Tricarb, Perkin-Elmer). L'association a été calculée en  $\mu\text{g}$  de protéines par mg de protéines cellulaires et la valeur de captation sélective a été calculée en soustrayant de la valeur d'association en EC les valeurs d'association protéique et de dégradation.

#### *Traitements avec les inhibiteurs de l'endocytose*

Pour les traitements inhibant l'endocytose, les cellules ont été pré-incubées 30 min (1 h pour la cytochalasine D et le PP2; 2 h pour la toxine B) en présence de 25 mM de chlorure d'ammonium, 0,45 M de sucrose, la combinaison d'azoture de sodium (5 mM) / 2-D-

désoxyglucose (50 mM), 100  $\mu$ M de chlorpromazine (CPZ), 100 mM de génistéine, 50  $\mu$ M de cytochalasine D, 50  $\mu$ M de pervanadate de sodium ou 20 nM de PP2 avant l'ajout des lipoprotéines radio-marquées. Le traitement a été maintenu tout au long de l'essai d'association. La solution stock de 5 mM de pervanadate de sodium a été obtenue en mélangeant dans un ratio 1 : 1 une solution de 10 mM de peroxyde d'hydrogène à une solution de 10 mM d'orthovanadate de sodium. Pour le traitement à la sous-unité B de la toxine de *C. difficile*, la toxine a été resuspendue le jour de l'expérience dans de l'eau pour atteindre une concentration finale de 100 ng /  $\mu$ L (solution stock 1000 fois concentrée) et a été conservée à -20°C pour une période maximale d'une semaine. Les agents perturbant l'intégrité des radeaux lipidiques ont été ajoutés 1 heure avant les expériences à raison de 0,5 U / mL pour la SMase; 10 mM pour la M $\beta$ -CD et ont été retirés par un lavage au PBS de la couche cellulaire. Pour les essais avec des cellules traitées avec des inhibiteurs de la synthèse de (glyco)sphingolipides, la privation de sphingolipides a été effectuée par la croissance pendant 48 heures (24 h pour la myriocine) dans du MEM contenant 10 % de SVF et 10  $\mu$ M de myriocine, ou 20  $\mu$ g / mL de FB<sub>1</sub>, ou 100  $\mu$ M de NB-DGJ tel que décrit par Cheng *et al.* (2006).

#### *Essais de dégradation protéique*

Au milieu d'incubation qui a été récupéré des essais d'association ont été ajoutés 0,1 volume de BSA à 20 % et 500  $\mu$ L d'acide trichloroacétique (TCA) à 24 % (*p/v*) et le tout a été incubé pendant 30 min à 4° C. Après une centrifugation (15 minutes; 2200 g), le surnageant contenant les petits peptides radioactifs produits par la dégradation a été récupéré. L'iode libre a été soustrait du surnageant par une incubation de 5 min du surnageant à la température ambiante en présence de 10  $\mu$ L d'une solution d'iodure de potassium à 40 % *p/v* et de 40  $\mu$ L d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30 %. Ensuite, 2 mL de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) ont été ajoutés et le surnageant ainsi formé a été récupéré et la radioactivité dosée au compteur gamma. Pour l'ensemble des expériences, la dégradation des <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub>, dont la valeur contrôle se situe habituellement entre 10 et 20 ng/mg de protéines cellulaires, n'a pas été mesurée.

### *Essais de liaison*

Pour les essais de liaison, les cellules HepG2 ont été traitées tel qu'indiqué plus haut mais en présence de 50 mM HEPES et incubées 2 h à 4 °C en présence de lipoprotéines (20 µg / mL) radiomarquées ( $^{125}\text{I}$ -LDL ou -HDL<sub>3</sub>).

### *Recyclage de la transferrine*

Les cellules HepG2 traitées ou non ont été incubées pendant 15 min à 37 °C en présence de 5 µg / mL (*Pulse*) de  $^{125}\text{I}$ -transferrine puis de 125 µg / mL de transferrine non radioactive pour 1 h à 37 °C (*Chasse*). La  $^{125}\text{I}$ -transferrine liée à la surface cellulaire a été enlevée par lavage (2 X 1 mL) avec une solution contenant 0,2 M d'acide acétique à pH 2,5 et 0,5 M de NaCl. Pour mesurer l'internalisation de la transferrine, les cellules ont été solubilisées dans 1,5 mL de NaOH (0,1 N). Pour déterminer la quantité de transferrine recyclée suivant la chasse de 60 min, la radioactivité associée à la fraction précipitable à l'acide trichloroacétique (24%) récupérée du milieu d'essai a été dosée.

### *Essais d'hydrolyse et de sensibilité à la chloroquine*

Les cellules, ensemencées en plaques de 6 puits de 9,4 cm<sup>2</sup>, ont été pré-incubées avec les différents traitements puis pré-incubées une heure supplémentaire en présence ou non de 100 µM de chloroquine avant l'ajout des  $^3\text{H}$ -EC-lipoprotéines. Les cellules ont été incubées comme pour les essais d'association puis lavées suivant le même protocole. Les cellules ont ensuite été délipidées par la méthode de Hara et Radin (1978) avec 2 mL d'un mélange d'hexane / isopropanol (3 : 2) puis incubées à la température ambiante pendant 1 heure. Le surnageant a été retiré des puits et les cellules ont été lavées à nouveau avec 1 mL de cette même solution. Les 2 fractions ainsi prélevées ont été combinées puis évaporées à l'aide

d'azote gazeux sous la hotte. L'extrait sec a été resuspendu dans 50  $\mu\text{L}$  de chloroforme puis déposé sur une plaque de chromatographie en couche mince de 20 cm x 20 cm (gel de silice G, Sigma) pour migrer dans une chambre à chromatographie saturée avec un mélange d'éther de pétrole, d'éther anhydre et d'acide acétique glacial (90:10:1). Vingt  $\mu\text{L}$  des standards de cholestérol (10 mg / mL) et de cholestéryl oléate (10 mg / mL) ont migré en parallèle. La révélation de la migration a été réalisée dans une chambre saturée de vapeur d'iode. Les échantillons de cholestérol libre et estérifié ont été récupérés par grattage et leur radioactivité dosée au compteur bêta. La valeur d'association lipidique a été calculée comme étant la somme de la radioactivité associée au cholestérol libre et de celle associée au cholestérol estérifié. L'efficacité d'hydrolyse a été calculée comme le rapport entre la radioactivité associée au cholestérol libre et celle associée au cholestérol total. Ces valeurs ont été exprimées par mg de protéines cellulaires dosées par la méthode de Lowry (1951) sur les puits délipidés.

*Surexpression transitoire de la dynamine-2 WT et de la dynamine-2<sup>K44A</sup> dans les cellules HepG2*

Les cellules ont été transfectées par électroporation à l'aide du Microporator (NanoEnTek; Hopkinton, MA) selon les instructions du fabricant. Brièvement, le jour avant l'expérience, les cellules HepG2 en culture ont été détachées en ajoutant de la trypsine, lavées puis comptées. Les cellules ( $35 \times 10^6$ ) ont ensuite été mélangées dans le tampon de resuspension fourni avec les vecteurs d'expression recombinants (pcDNA3.1/dyn-2K44A ou pcDNA3.1/dyn-2WT;  $2 \mu\text{g ADN} / 10^6$  cellules) puis transfectées avec une impulsion de 1200 V pendant 50 millisecondes. Les cellules ont ensuite étéensemencées sur des plaques de 12 puits ( $2,4 \times 10^6$  cellules / puits) contenant 1 mL de MEM sans SVF préchauffé à 37°C. Les essais d'association ont eu lieu 24 h suivant la transfection.

### *Isolation des radeaux lipidiques par gradient discontinu de sucrose*

Les cellules (traitées ou non; trois flacons de 75 cm<sup>2</sup>/traitement) ont été lavées deux fois avec 15 ml de PBS. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 2 ml d'une solution de bicarbonate de sodium (500 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11) puis homogénéisées sur glace à l'homogénéiseur Dounce (20 coups), puis par trois coups de 10 secondes au polytron (Brinkman) et enfin soniquées (Branson Sonifier 250) trois fois pendant 20 secondes à 50 % de la puissance maximale. L'homogénat a été mélangé à 2 mL d'une solution de sucrose tamponnée à l'acide morpholinoéthanesulfonique (MBS : 85 % sucrose à pH 6,5) dans un tube allant à l'ultracentrifugeuse. Au tube ont été ajoutés 4 mL d'une solution de MBS contenant 35 % de sucrose et 250 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> puis 4 mL d'une solution de MBS contenant 5 % de sucrose et 250 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Le gradient a été centrifugé à 190 000 g pendant 18 h à 4°C dans un rotor SW41 (Beckman). Par la suite, douze fractions de 1 mL ont été collectées à partir du haut du gradient. Les protéines des fractions 1-12 ont été précipitées à l'acide trichloroacétique (21%) et resuspendues dans du NaOH à 0,2 N contenant 1 % de SDS (sodium dodécyl sulfate). La fraction 13 (culot) a été resuspendue dans 300 µL de MBS à pH 6,5. Cinquante µL de chacune des fractions resuspendues ont été déposés sur gel pour un immunobuvardage de type Western.

### *Électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE) et immunobuvardage de type western*

Suivant l'isolement des membranes sur gradient discontinu de sucrose, les protéines (50 µL de chacune des fractions puis du culot) ont migré sur gel de polyacrylamide (12 % de séparation; 4 % d'empilement) dans le système de tampons de Laemmli (1970). Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose selon la méthode de Burnette (1981). La membrane a ensuite été bloquée pendant 16 h dans une solution de TBS contenant 1 % de Tween et 5 % de lait en poudre. La membrane a été hybridée pendant 1 h 30 min à 37°C en présence d'anticorps polyclonaux anti-SR-BI (IgG de lapin; 1:5000), lavée trois fois puis hybridée avec un anticorps monoclonal anti-IgG (IgG de chèvre; 1 : 5000) couplé à la

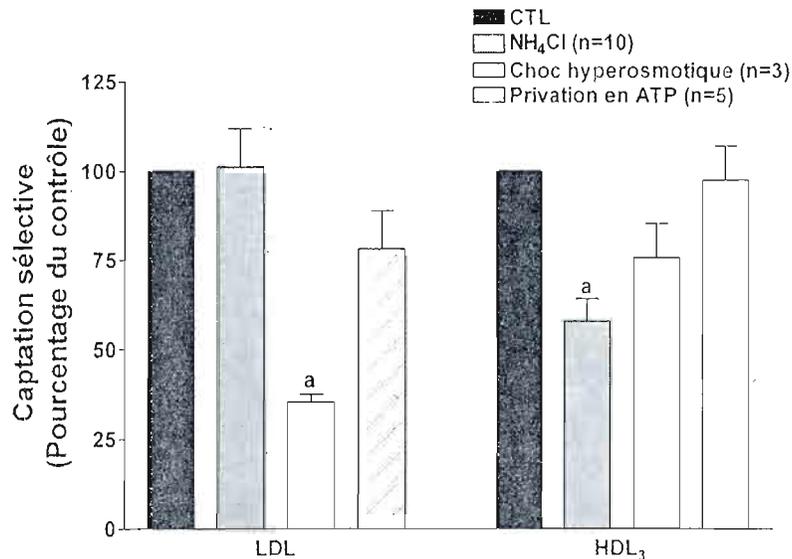
peroxydase de raifort pendant 1 h 30 min à 37°C. La réaction colorimétrique a été captée sur film Kodak après réaction en présence du substrat chromogène de la peroxydase.

#### *Autres méthodes*

La quantité de protéines cellulaires a été dosée par la méthode de Lowry *et al.* (1951) en présence de 0,1 N de NaOH avec la BSA comme standard. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat. L'analyse statistique des expériences indépendantes a été réalisée par un test de *t* pairé de Student lorsqu'un seul traitement a été utilisé ou par analyse de variance (ANOVA) lors d'expériences visant à comparer l'effet de plusieurs traitements. Les résultats ont été jugés significatifs à des valeurs de  $P < 0,05$ .

## CHAPITRE V: RÉSULTATS

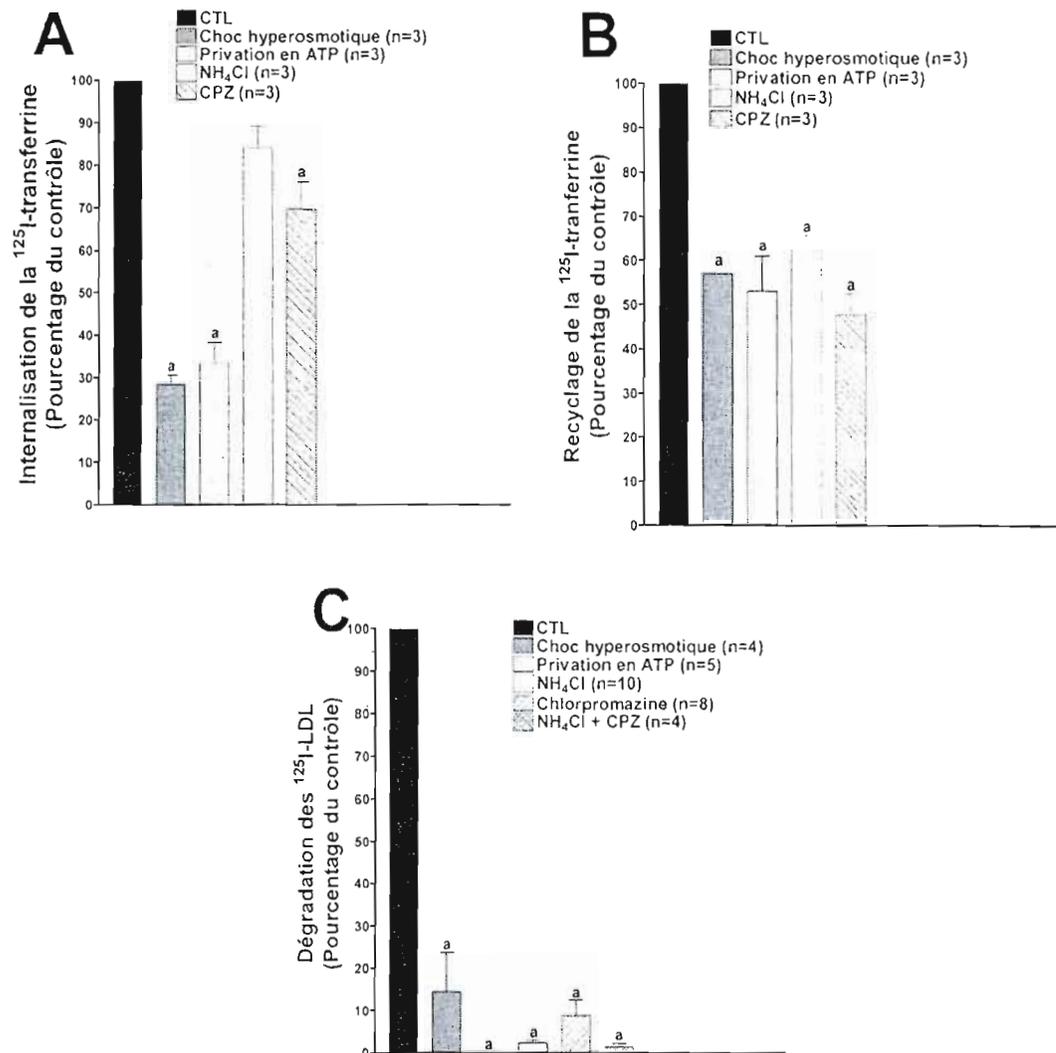
Il avait déjà été suggéré par nous (Rhains *et al.*, 2004) et d'autres (Eckhardt *et al.*, 2004) que l'activité de captation sélective de SR-BI dépende de mécanisme d'endocytose ou de rétroendocytose. Ici, nous avons vérifié que l'inhibition de ces mécanismes, à l'aide d'inhibiteurs connus dans la littérature pour les affecter, influence la captation sélective des esters de cholestérol à partir des deux principales classes de lipoprotéines chez l'humain, les LDL et les HDL. Pour ce faire, nous avons d'abord effectué des essais de captation sélective



**Figure 1: Effet des inhibiteurs classiques de l'endocytose sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL<sub>3</sub>.** Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min à 37 °C avec 25 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 0,45 M de sucrose (choc hyperosmotique), ou la combinaison NaN<sub>3</sub> (5 mM)/2-d-désoxyglucose (50 mM) avant d'être incubées 4 h à 37 °C en présence de lipoprotéines (<sup>125</sup>I- ou <sup>3</sup>H-EC-LDL ou -HDL<sub>3</sub>) radiomarquées (20 µg/mL). a: P<0,001. Les résultats (expériences indépendantes réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par ANOVA.

en présence d'inhibiteurs classiquement employés pour inhiber la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, soit le chlorure d'ammonium (Sandvig *et al.*, 1987) et le choc hyperosmotique au sucrose (Heuser et Anderson, 1989) ainsi que la déplétion en énergie. Comme on le voit à la **Figure 1**, la captation sélective des EC-LDL dans les cellules HepG2

est sensible au choc hyperosmotique (réduction d'environ 65% de la valeur contrôle) alors que celle des EC-HDL<sub>3</sub> se trouve réduite par l'acidification du cytosol au NH<sub>4</sub>Cl (réduction



**Figure 2:** Effet du choc hyperosmotique, de la privation en ATP, du NH<sub>4</sub>Cl et de la chlorpromazine sur l'internalisation et le recyclage de la <sup>125</sup>I-transferrine et la dégradation des <sup>125</sup>I-LDL. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées en présence de 25 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 0,45 M de sucrose (choc hyperosmotique), la combinaison NaN<sub>3</sub> (5 mM)/2-d-désoxyglucose (50 mM) avant d'être incubées 15 min à 37 °C en présence de 5 µg/mL (*Pulse*) de <sup>125</sup>I-transferrine puis de 125 µg/mL de transferrine non radioactive pour 1 h à 37 °C (Chasse). La <sup>125</sup>I-transferrine liée à la surface cellulaire a été enlevée par lavage (2 X 1 mL) à l'acide acétique (0,2 M, pH 2,5) contenant 0,5 M de NaCl. A) Internalisation de la <sup>125</sup>I-transferrine après 15 min. B) Recyclage de la <sup>125</sup>I-transferrine: la radioactivité associée à la fraction précipitable à l'acide trichloroacétique (24%) récupérée du milieu d'essais après la chasse de 60 min a été dosée. a: P < 0,001. Les résultats (expériences indépendantes réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par ANOVA.

d'environ 35% de la valeur contrôle). La privation d'énergie cellulaire par le traitement des cellules avec la combinaison  $\text{NaN}_3$ /2-d-désoxyglucose n'affecte pas, elle, la captation sélective de l'un ou l'autre des deux ligands de SR-BI.

L'efficacité des traitements a aussi été testée par des essais de recyclage de la transferrine. Les trois traitements ont montré une capacité à réduire l'internalisation sur 15 minutes de la  $^{125}\text{I}$ -transferrine (**Figure 2 A**) ainsi que son recyclage suivant une chasse d'une heure (**Figure 2 B**) et une capacité à inhiber presque totalement la dégradation des LDL (**Figure 2 C**).

Ces résultats indiquent que l'inhibition de synthèse d'ATP n'affecte pas la captation sélective, suggérant qu'elle est effectuée par un mécanisme qui n'en dépend pas. Ils indiquent aussi qu'une ou plusieurs voies d'endocytose pourraient bien réguler la captation sélective. Sachant que certaines drogues cationiques amphiphiles comme la chlorpromazine (CPZ), qui inhibe l'endocytose dépendante de la clathrine (Wang *et al.*, 1993), peuvent aussi inhiber l'endocytose indépendante de la clathrine (Cheng *et al.*, 2006), nous avons ensuite testé l'effet de la CPZ sur la captation sélective en combinaison ou non avec un traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Le traitement avec la CPZ a résulté en une diminution de l'association en EC-LDL (60% environ de la valeur contrôle), effet qui potentialise celui du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (**Figure 3 A**), ainsi qu'en une diminution de l'association des  $^{125}\text{I}$ -LDL de l'ordre de 25%. Le traitement avec cette drogue a montré un effet similaire sur l'association des EC-HDL<sub>3</sub> (**Figure 3 B**) sans toutefois affecter l'association des  $^{125}\text{I}$ -HDL<sub>3</sub>. De plus, le traitement des cellules à la CPZ a permis d'inhiber d'environ 50% la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub>. À ce sujet, les résultats obtenus montrent aussi un effet additif du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et de la CPZ sur la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub>, atteignant environ 25% de la valeur contrôle lorsque combinés. Tout comme le traitement avec les inhibiteurs classiques de l'endocytose, le traitement avec la CPZ a permis, tel qu'attendu, de réduire de façon significative l'internalisation de la  $^{125}\text{I}$ -transferrine (**Figure 2 A**) et son recyclage (**Figure 2 B**) ainsi que la dégradation des LDL (**Figure 2 C**).

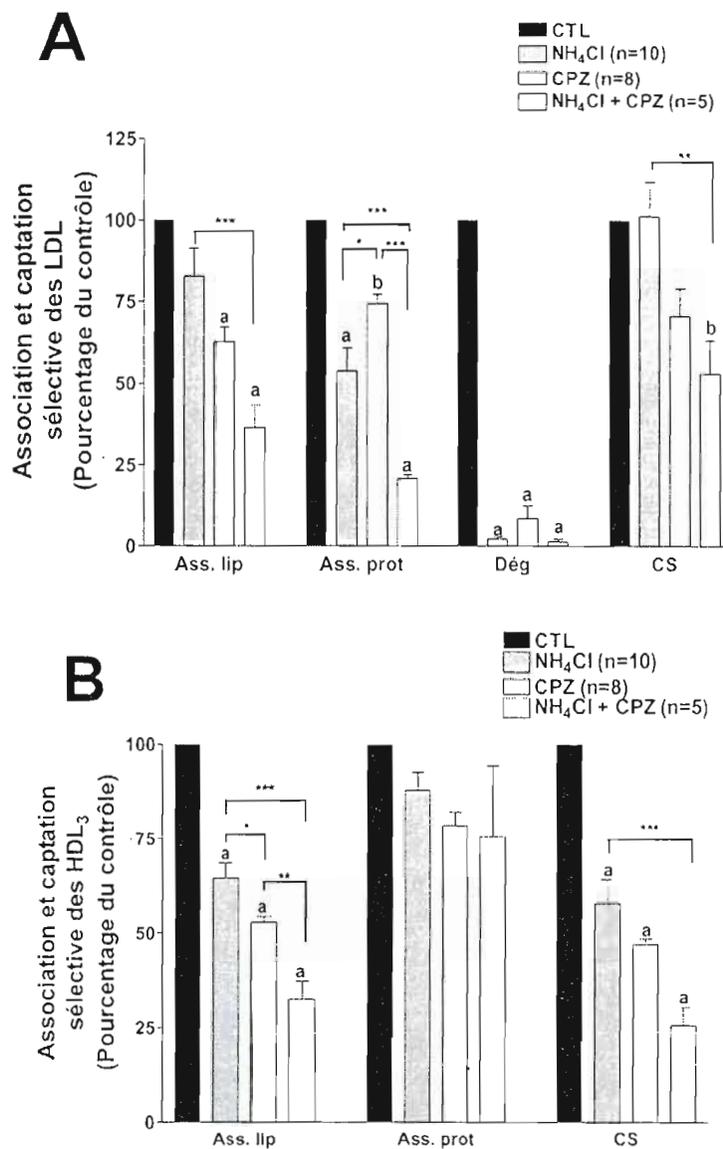
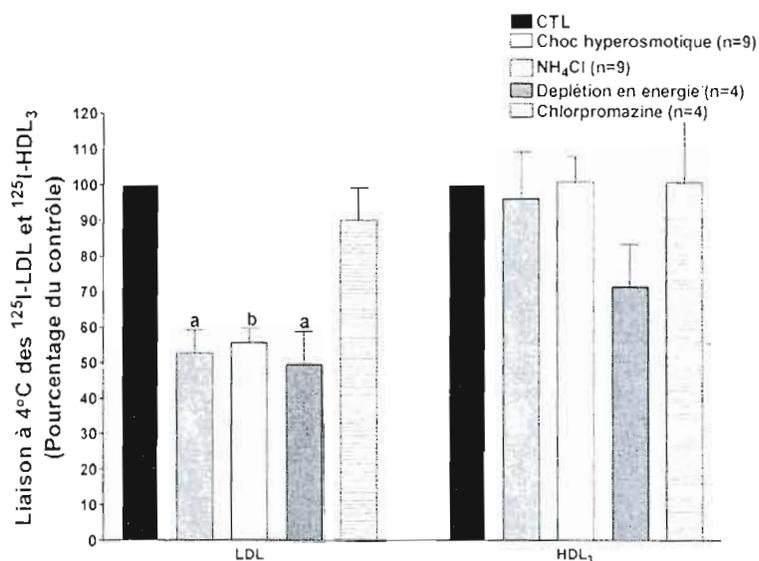


Figure 3: Effet de la chlorpromazine et du NH<sub>4</sub>Cl sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL<sub>3</sub>. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min à 37 °C avec 25 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 100 μM de chlorpromazine (CPZ), ou la combinaison des deux avant d'être incubées 4 h à 37 °C en présence de 20 μg/mL (A) de LDL ou (B) de HDL<sub>3</sub> radiomarquées (<sup>125</sup>I- ou <sup>3</sup>H-EC-). a: Différent du contrôle P<0,001; b: Différent du contrôle P<0,01; c Différent du contrôle P<0,05; \* Traitements différents P<0,05; \*\* Traitements différents P<0,01; \*\*\* Traitements différents P<0,001. Les résultats (expériences indépendantes réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par ANOVA.



**Figure 4:** Effet des inhibiteurs classiques de l'endocytose sur la liaison protéique à 4 °C des <sup>125</sup>I-LDL et -HDL<sub>3</sub>. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min à 37 °C avec 25 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 0,45 M de sucrose (choc hyperosmotique), la combinaison NaN<sub>3</sub> (5 mM)/2-d-désoxyglucose (50 mM), ou 100 μM de chlorpromazine (CPZ) avant d'être incubées 2 h à 4 °C en présence de lipoprotéines (20 μg/mL) radiomarquées (<sup>125</sup>I-LDL ou -HDL<sub>3</sub>). a: Différent du contrôle P<0,01; b: Différent du contrôle P<0,05. Les résultats (expériences indépendantes réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par ANOVA.

L'efficacité de la CPZ à diminuer la captation sélective des EC-LDL et -HDL<sub>3</sub> indique qu'une voie commune aux deux ligands régule la captation sélective.

Afin de confirmer que l'effet observé des traitements sur la captation sélective dépend bien de l'inhibition de mécanismes d'endocytose, nous avons vérifié si ces traitements n'affectaient pas la liaison des lipoprotéines à la surface cellulaire. Des essais d'association effectués à 4°C (**Figure 4**) montrent qu'ils n'ont aucun effet significatif sur l'association des <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub>. Cependant, ces traitements, à l'exception de la CPZ, réduisent de 40 à 50% la liaison des <sup>125</sup>I-LDL à la surface cellulaire et ce, de façon hautement significative. La diminution de la liaison des <sup>125</sup>I-LDL à la surface cellulaire en présence du sucrose suggère que l'effet du choc hyperosmotique sur la captation sélective des EC-LDL pourrait probablement ne pas être causé par l'inhibition de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine alors que cela pourrait bien être le cas pour la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub>. La

captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub> pourrait donc dépendre de l'endocytose régulée par la clathrine alors qu'on ne peut rien conclure à propos de celle des EC-LDL si ce n'est qu'elle est sensible à la CPZ.

Étant donné qu'il a été constaté un effet de la CPZ, traditionnellement associé à l'inhibition de l'endocytose dépendante de la clathrine, sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL<sub>3</sub>, nous avons ensuite voulu vérifier si dans des cellules traitées au NH<sub>4</sub>Cl et à la CPZ les EC des deux ligands ne verraient pas leur métabolisme perturbé.

Nous avons donc vérifié l'effet de ces traitements sur l'hydrolyse des EC-LDL et EC-HDL<sub>3</sub> ainsi que leur sensibilité à la chloroquine. En situation normale (contrôle), 51 % des EC-LDL totaux associés aux cellules sont hydrolysés et 85 % de ces derniers le sont dans un

**Tableau II: Effet des différents traitements inhibant l'endocytose sur l'hydrolyse des EC-LDL**

Traitements	CL ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	CE ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Total ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	% Hydrolyse	Sensibilité à la Chloroquine (%)
CTL	0,234	0,224	0,458	51	85
Chloroquine	0,010	0,122	0,132	8	
NH <sub>4</sub> Cl	0,025	0,129	0,154	16	44
NH <sub>4</sub> Cl et Chloroquine	0,015	0,159	0,174	9	
Chlorpromazine	0,008	0,175	0,183	4	0
Chlorpromazine et Chloroquine	0,006	0,099	0,105	5	
NH <sub>4</sub> Cl et Chlorpromazine	0,005	0,086	0,091	5	

Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min à 37°C en présence ou non de chloroquine puis un 30 min supplémentaire en présence de 25 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 100  $\mu\text{M}$  de CPZ ou la combinaison des deux avant l'ajout des <sup>3</sup>H-EC-LDL (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pour 4 h. Les lipides ont ensuite été extraits puis séparés par TLC tel que décrit dans le *Matériel et méthodes*. Une expérience indépendante a été réalisée en duplicata.

compartiment sensible à la chloroquine (**Tableau II**). En présence de NH<sub>4</sub>Cl ou de CPZ, la masse d'EC-LDL hydrolysés diminue respectivement de 90 et 97 %. En ce qui concerne les HDL<sub>3</sub> (**Tableau III**), 81 % des EC hydrolysés par les cellules non-traitées l'ont été dans un

compartiment sensible à la chloroquine, l'ajout de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et de CPZ au milieu d'essai a fait diminuer respectivement la masse hydrolysée de 83 et 92 %. La CPZ semble donc inhiber une ou des voie(s) conduisant à l'hydrolyse des EC. De son côté, le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  semble empêcher le fonctionnement des lysosomes comme le fait la chloroquine.

**Tableau III: Effet des différents traitements inhibant l'endocytose sur l'hydrolyse des EC-HDL<sub>3</sub>**

Traitements	CL ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	CE ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Total ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	% Hydrolyse	Sensibilité à la Chloroquine (%)
CTL	0,119	0,162	0,281	42	
Chloroquine	0,010	0,113	0,123	8	81
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,020	0,092	0,112	18	
$\text{NH}_4\text{Cl}$ et Chloroquine	0,014	0,095	0,108	13	27
Chlorpromazine	0,010	0,103	0,113	9	
Chlorpromazine et Chloroquine	0,010	0,067	0,077	13	0
$\text{NH}_4\text{Cl}$ et Chlorpromazine	0,007	0,056	0,063	11	

Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min à 37°C en présence ou non de chloroquine puis un 30 min supplémentaire en présence de 25 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 100  $\mu\text{M}$  de CPZ ou la combinaison des deux avant l'ajout des  $^3\text{H}$ -EC-HDL<sub>3</sub> (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pour 4 h. Les lipides ont ensuite été extraits puis séparés par TLC tel que décrit dans le *Matériel et méthodes*. Les résultats proviennent d'une expérience indépendante réalisée en duplicata.

Avant d'exclure la possibilité que la captation sélective des EC-LDL ne dépende de mécanisme d'endocytose et afin de caractériser davantage le mécanisme responsable de celle des EC-HDL<sub>3</sub>, nous avons vérifié la dépendance de la captation sélective aux filaments d'actine, lesquels sont essentiels au fonctionnement de certains mécanismes d'endocytose (Durrbach *et al.*, 1996). Pour y parvenir, nous avons employé la cytochalasine D (Figure 5), un agent dépolymérisant des filaments d'actine (Goddette et Frieden, 1986).

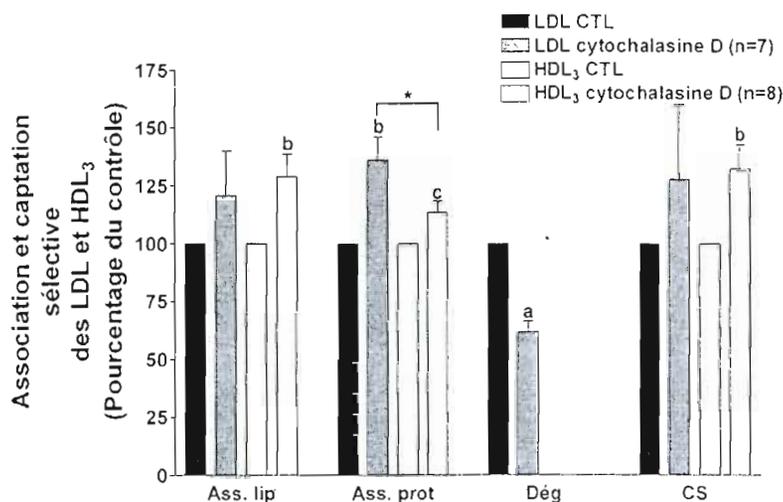
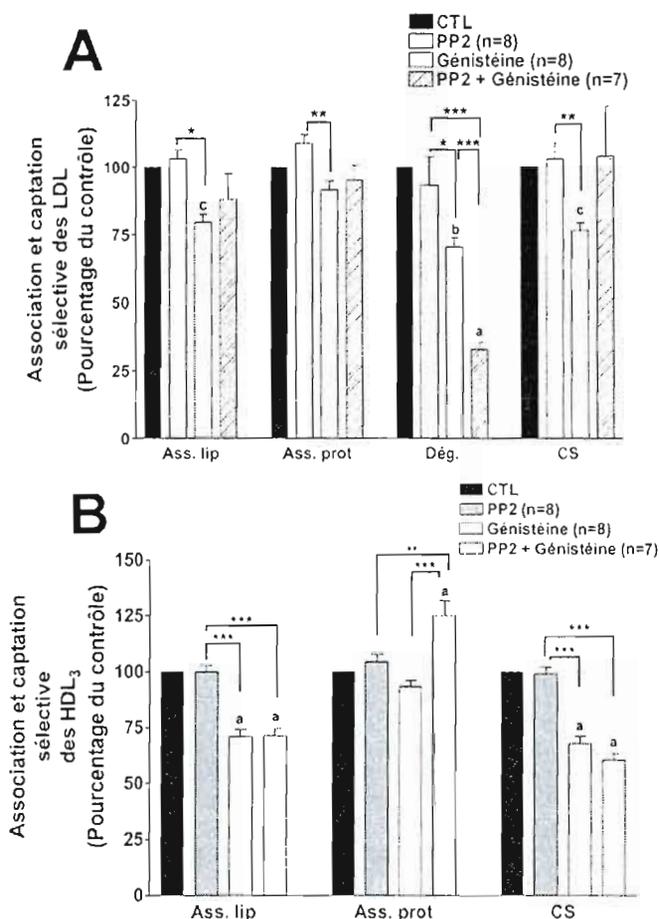


Figure 5: Effet de la cytochalasine D sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et EC-HDL<sub>3</sub>. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 1 h à 37 °C avec 50  $\mu$ M de cytochalasine D avant l'ajout de 20  $\mu$ g/mL des lipoprotéines (LDL ou HDL<sub>3</sub>) radiomarquées (<sup>125</sup>I ou <sup>3</sup>H-EC) pendant 4 h à 37 °C. a: Différent du contrôle P<0,0001; b: Différent du contrôle P<0,01; c: Différent du contrôle P<0,05; \*: Traitements différents entre-eux P<0,05. Les résultats (expériences indépendantes réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par un test de t païré de Student.

Les résultats montrent une augmentation de la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub> (environ 30% de plus que la valeur contrôle) en présence du traitement alors que seule une tendance à l'augmentation de la captation sélective des EC-LDL se dessine. Tel qu'attendu, la cytochalasine D a aussi entraîné une diminution de la dégradation des LDL (environ 40% de moins que le contrôle). Ces résultats suggèrent que la captation sélective des deux ligands ne dépend donc pas des filaments d'actine ou que les mécanismes d'endocytose requérant les filaments d'actine régulent négativement la captation sélective.

Parmi les voies d'endocytose indépendante de la clathrine, on distingue entre autres l'endocytose dépendante des cavéoles. Bien qu'il soit rapporté que les cellules HepG2 n'expriment que faiblement ou pas du tout la cavéoline-1 (Fujimoto *et al.*, 2001) de façon endogène, nous avons quand même cherché à déterminer l'importance de cette voie. La régulation de cette dernière pouvant résulter de l'activation de protéines tyrosine kinases (PTK) de la famille de Src via l'activation de sous-unité  $\beta\gamma$  de protéines G conduisant à la

phosphorylation de la dynamine-2 et de la cavéoline-1 (Aoki *et al.*, 1999; Shajahan *et al.*, 2004), le PP2, un inhibiteur des PTK de la famille de Src a donc été employé pour tester si



**Figure 6:** Effet des inhibiteurs de protéines tyrosine kinases sur la captation sélective des EC-LDL ou -HDL<sub>3</sub>. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 1 h avec 20 nM de PP2, 30 min avec 100 mM de génistéine ou une combinaison des deux traitements puis incubées 4 h à 37 °C en présence de (A) LDL ou (B) HDL (20 µg/mL) radiomarquées (<sup>125</sup>I- ou <sup>3</sup>H-EC-). a: Différent du contrôle P<0,001; b: Différent du contrôle P<0,01; c: Différent du contrôle P<0,05; \*: Traitements différents P<0,05; \*\*: Traitements différents P<0,01; \*\*\*: Traitements différents P<0,001. Les résultats (expériences indépendantes réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par ANOVA.

cette voie était empruntée par le SR-BI lors de la captation sélective. Le traitement des cellules HepG2 à l'aide du PP2 n'a eu aucun effet sur la captation sélective des EC-LDL

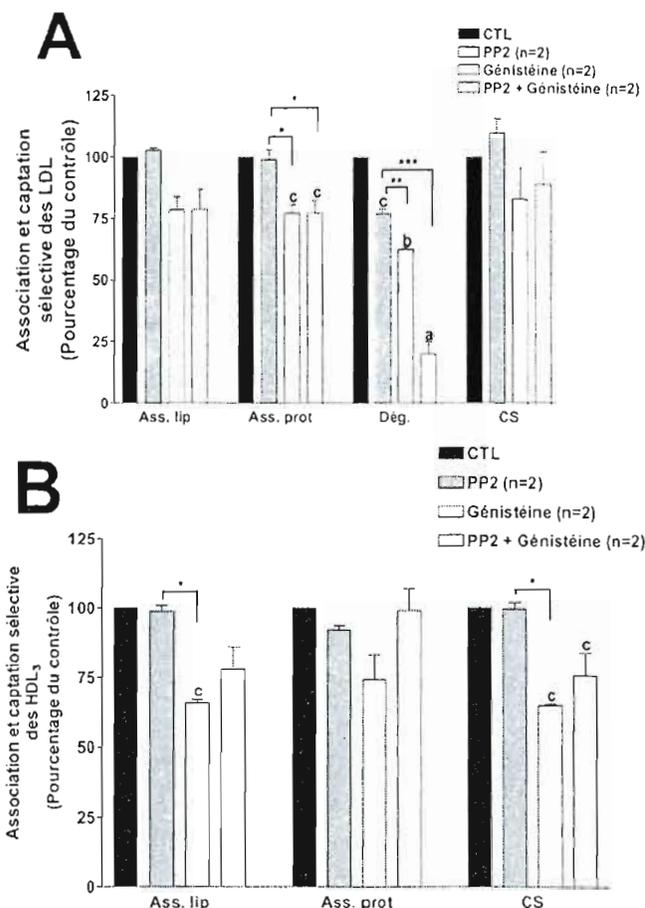


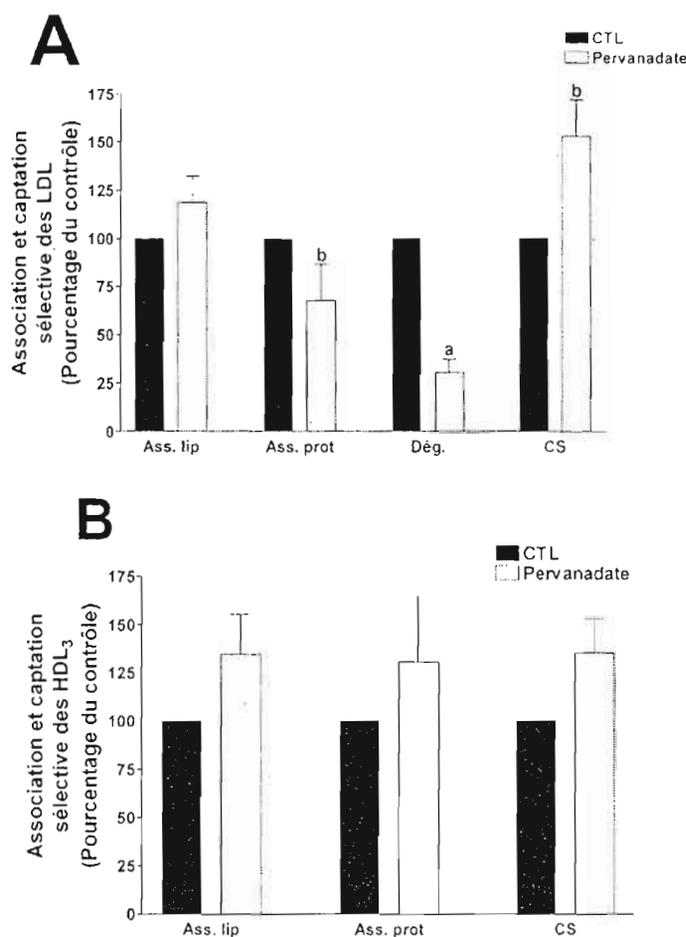
Figure 7: Effet des inhibiteurs de protéines tyrosine kinases sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL<sub>3</sub> dans des cellules surexprimant la cavéoline 1. Les cellules surexprimant la cavéoline 1 (Cav13) ont été traitées 1 h avec 20 nM de PP2, 30 min avec 100 mM de génistéine ou une combinaison des deux traitements puis incubées 4 h à 37°C en présence de LDL (A) ou HDL (B) (20 µg/mL) radiomarquées (<sup>125</sup>I- ou <sup>3</sup>H-EC). a: Différent du contrôle P<0,001; b: Différent du contrôle P<0,01; c: Différent du contrôle P<0,05; \*: Traitements différents P<0,05; \*\*: Traitements différents P<0,01; \*\*\*: Traitements différents P<0,001. Les résultats (expériences indépendantes réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par ANOVA.

(Figure 6 A) ni sur celle des EC-HDL<sub>3</sub> (Figure 6 B). Comme dans certains modèles cellulaires, il est possible de distinguer d'autres voies d'endocytose indépendante de la clathrine de celle dépendante des cavéoles (Cheng *et al.*, 2006) par leur sensibilité à la phosphorylation de certaines protéines, nous avons employé la génistéine, un inhibiteur plus général des PTK. Le traitement à la génistéine a résulté en une diminution d'environ 25% de la captation sélective des EC-LDL (Figure 6 A) et des EC-HDL<sub>3</sub> (Figure 6 B). Les résultats

montrent qu'en plus de son effet sur la captation sélective des EC-LDL, la génistéine a provoqué une légère diminution (environ 25%) de la dégradation des LDL et qu'elle potentialise l'effet du PP2 sur la dégradation des LDL.

De façon à exclure complètement l'implication d'une voie régulée par les cavéoles dans la captation sélective, nous avons ensuite employé des cellules HepG2 surexprimant la cavéoline-1 (cellules Cav13) avant de les traiter avec le PP2 ou la génistéine. La surexpression de cavéoline-1 n'a pas changé la sensibilité à la génistéine de la captation sélective des EC-LDL (**Figure 7 A**) ou des EC-HDL<sub>3</sub> (**Figure 7 B**). De plus, les cellules Cav13 ne se sont pas révélées être plus sensibles que les cellules HepG2 aux effets du PP2 en ce qui concerne l'association lipidique, protéique ou la captation sélective des deux ligands.

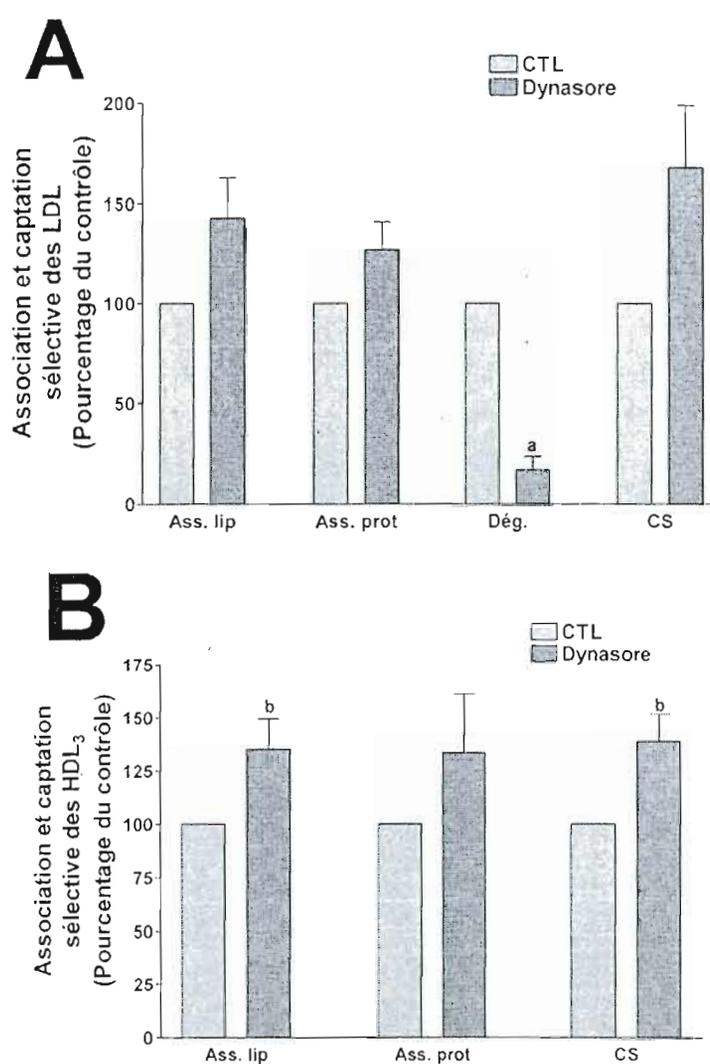
Comme certains (Aoki *et al.*, 1999) ont aussi montré que l'inhibition des phosphatases cellulaires résultait en une inhibition de l'endocytose dépendante des cavéoles ainsi qu'en une réduction du nombre de vésicules marquées par la présence de cavéoline-1, nous avons traité des cellules HepG2 avec du pervanadate. Le traitement au pervanadate a résulté en une diminution de l'association protéique (diminution d'environ 40%) et de la dégradation (environ 35% du contrôle) des LDL ainsi qu'en une augmentation de l'ordre de 60% de la captation sélective des EC-LDL (**Figure 8 A**). Le pervanadate semble donc avoir bloqué en partie l'activité du rLDL, redistribuant ainsi les EC vers le SR-BI. Bien qu'aucune différence significative n'ait été obtenue lors des essais de captation sélective d'EC-HDL<sub>3</sub> en présence de pervanadate (**Figure 8 B**), on remarque tout de même une tendance à l'augmentation de l'association lipidique, protéique et de la captation sélective pour ce ligand.



**Figure 8:** Effet du pervanadate de sodium sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL<sub>3</sub>. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min en présence de 50  $\mu$ M de pervanadate de sodium avant d'être incubées 4 h à 37°C en présence de 20  $\mu$ g/mL de LDL (A) ou HDL<sub>3</sub> (B) radiomarquées (<sup>125</sup>I- ou <sup>3</sup>H-EC). a: Différent du contrôle P<0,005; b: Différent du contrôle P<0,05. Les résultats (expériences indépendantes (n=4) réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par un test de t pairé de Student.

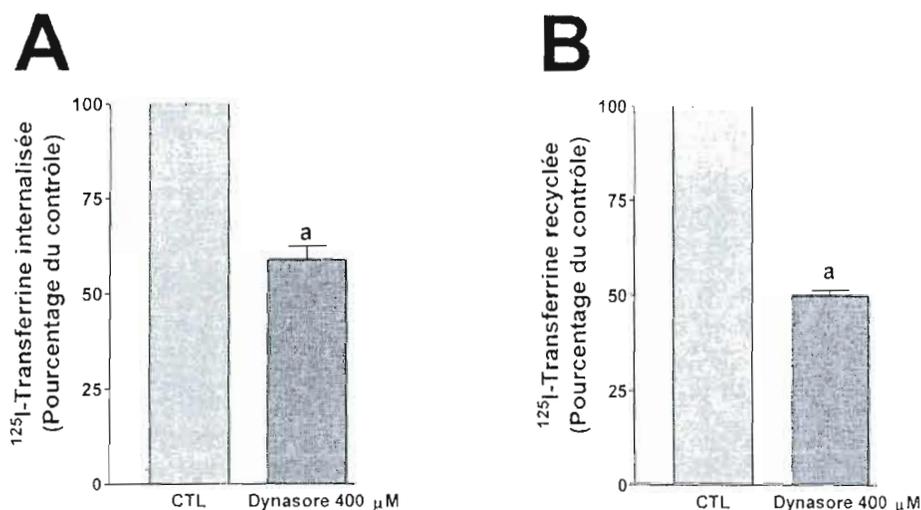
Les voies d'endocytose indépendante de la clathrine peuvent être davantage distinguées entre-elles sur la base de leur dépendance ou non à l'activité de la dynamine ainsi que de petites GTPases de la famille de Rho (Mayor et Pagano, 2007). De façon à caractériser davantage la voie d'endocytose semblant être responsable de la captation sélective, nous avons traité ensuite les cellules HepG2 avec un inhibiteur pharmacologique de la dynamine, le dynasore (Macia *et al.*, 2006).

L'inhibition de la dynamine-2 n'a eu aucun effet sur l'association lipidique ou protéique des LDL ainsi que sur la captation sélective des EC-LDL (**Figure 9 A**) bien qu'on note une diminution très importante de la dégradation de ces dernières (plus de 80% de diminution par rapport au contrôle). Les résultats indiquent cependant une tendance à l'augmentation de la captation sélective des EC-LDL en présence de dynasore. Ceci suggère que la voie



**Figure 9:** Effet du dynasore sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL<sub>3</sub>. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min en présence de 400  $\mu$ M de dynasore avant d'être incubées 4 h à 37°C en présence de 20  $\mu$ g/mL de LDL (A) ou HDL<sub>3</sub> (B) radiomarquées (<sup>125</sup>I- ou <sup>3</sup>H-EC). a: P<0,0005; b: P<0,05. Les résultats (expériences indépendantes (n=5) réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par un test de t pairé de Student.

empruntée est négativement régulée par la Dyn-2. En ce qui concerne l'effet du dynasore sur les HDL<sub>3</sub>, les résultats (**Figure 9 B**) montrent une augmentation significative de l'association lipidique et de la captation sélective (toutes deux de l'ordre de 25%). Ces augmentations suggèrent qu'un effet semblable pourrait être observé dans des cellules surexprimant un



**Figure 10: Effet du dynasore sur l'internalisation et le recyclage de la <sup>125</sup>I-transferrine.** Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min en présence de 400 µM de dynasore avant d'être incubées 15 min à 37°C en présence de 5 µg/mL (*Pulse*) de <sup>125</sup>I-transferrine puis de 125 µg/mL de transferrine froide pour 1 h à 37°C (*Chasse*). La transferrine liée à la surface cellulaire a été enlevée par lavage (2 X 1 mL) à l'acide acétique (0,2 M pH 2,5) contenant 0,5 M de NaCl. (A) Internalisation de la <sup>125</sup>I-transferrine après 15 min. (B) Recyclage de la transferrine : la fraction précipitable à l'acide trichloroacétique (24 %) récupérée du milieu d'essais après la *Chasse* de 60 min a été dosée. a: P<0,0001. Les résultats (expériences indépendantes (n=4) réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par un test de t pairé de Student.

mutant à effet dominant négatif de la Dyn-2 (Dyn2<sup>K44A</sup>).

Tel qu'attendu, le dynasore a réduit l'internalisation de la <sup>125</sup>I-transferrine (**Figure 10 A**) ainsi que son recyclage (**Figure 10 B**) démontrant son efficacité.

Pour confirmer l'indépendance à la dynamine suggérée ou la régulation négative par la Dyn-2 de la voie empruntée, des essais de captation sélective ont aussi été effectués sur des cellules HepG2 transfectées avec des vecteurs contenant l'ADNc de la dynamine-2 (Dyn2-WT) ou d'un mutant à effet dominant négatif de cette protéine (Dyn2<sup>K44A</sup>). Les cellules surexprimant la Dyn2-WT ne se comportent pas de façon significativement différente en comparaison de cellules non-transfectées que ce soit à l'égard des LDL (**Figure 11 A**) ou des HDL<sub>3</sub> (**Figure 11 B**). L'expression de la dynamine-2<sup>K44A</sup> tout comme le traitement des cellules au dynasore n'a pas affecté de façon significative l'association lipidique, protéique ou la captation sélective des LDL (**Figure 11 A**). Étonnamment, l'expression de ce mutant n'a pas réduit la

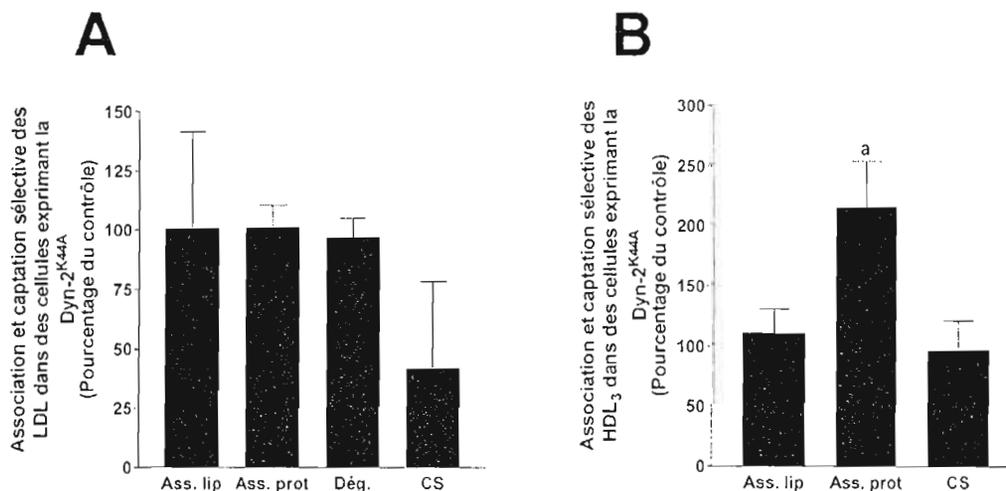


Figure 11: Effet de l'expression de la dynamine-2 mutante (Dyn2<sup>K44A</sup>) dans les cellules HepG2 sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL<sub>3</sub>. Les cellules HepG2 ont été transfectées par électroporation à l'aide des vecteurs contenant l'ADNc de la dynamine-2 (Dyn2-WT; Contrôle) ou d'un mutant à effet dominant négatif de cette protéine (Dyn2<sup>K44A</sup>) 24 h avant l'essai d'association. Les cellules ont ensuite été incubées 4 h à 37°C en présence de 20 µg/mL de LDL (A) ou HDL<sub>3</sub> (B) radiomarquées (<sup>125</sup>I- ou <sup>3</sup>H-EC-). a: P<0,05. Les résultats (expériences indépendantes (n=3) réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par un test de t pairé de Student.

dégradation des LDL. Contrairement à ce qui était observé chez les cellules traitées au dynasore, les cellules exprimant la dynamine-2<sup>K44A</sup> ont uniquement vu leur association protéique (<sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub>) augmenter par rapport aux cellules surexprimant la dynamine 2 de type sauvage (**Figure 11 B**). Ceci suggère une indépendance à l'activité de la dynamine lors de la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub> et des EC-LDL. Cependant, l'absence de diminution

significative de la dégradation des LDL suggère plutôt que le mutant est trop faiblement exprimé ou inefficace.

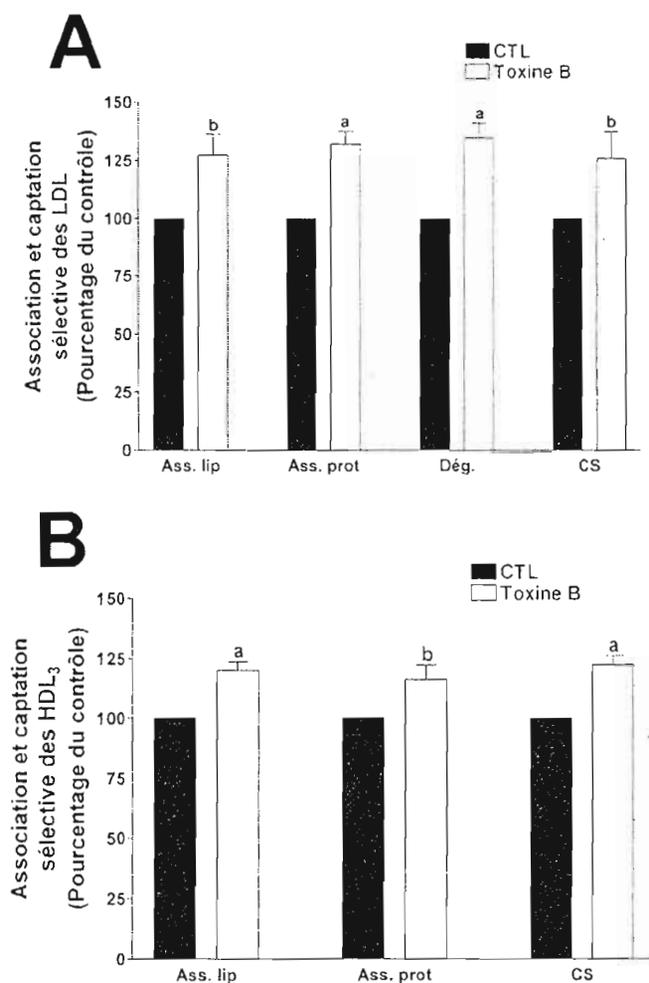


Figure 12: Effet de la toxine B de *C. difficile* sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et -HDL<sub>3</sub>. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 2 h à 37°C en présence 100 ng/mL de la toxine B de *C. difficile* avant d'être incubées 4 h à 37°C en présence de 20 µg/mL de LDL (A) ou HDL<sub>3</sub> (B) radiomarquées (<sup>125</sup>I- ou <sup>3</sup>H-EC-). a: Différent du contrôle P<0,005; b: Différent du contrôle P<0,05. Les résultats (expériences indépendantes (n=6) réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par un test de t païré de Student.

Étant donné que les voies d'endocytose indépendante de la clathrine régulée par la dynamine peuvent être aussi régulée par RhoA, l'importance des GTPases de la famille de Rho telles que RhoA et Cdc42 a ensuite été testée par l'ajout au milieu d'essai de la sous-unité B de la

toxine de *C. difficile* (CDTxB), un inhibiteur qui maintient ces dernières dans leur état inactif par glycosylation de leur site actif (Just *et al.*, 1995). La perturbation des mécanismes régulés par les protéines de la famille de Rho a augmenté de façon significative l'association lipidique, protéique et la captation sélective des LDL (**Figure 12 A**) d'environ 30% par rapport au contrôle. La CDTxB a aussi eu comme effet d'augmenter la dégradation de LDL (un peu plus de 30% d'augmentation). À l'instar de ce qui a été observé avec les LDL, les cellules HepG2 incubées en présence de cette toxine ont aussi vu augmenter leur association lipidique, protéique et leur captation sélective d'EC-HDL<sub>3</sub> (**Figure 12 B**) d'environ 25%. La tendance à l'augmentation observée pour ces deux ligands en présence de dynasore semble se maintenir en présence de la Toxine B; la captation sélective des deux ligands serait donc indépendante des protéines de la famille de Rho ou régulée négativement par leur activité, plus particulièrement par RhoA.

Les voies d'endocytose indépendante de la clathrine peuvent aussi être classées selon leur dépendance à certains constituants lipidiques de la membrane plasmique (Cheng *et al.*, 2006). C'est pourquoi nous avons vérifié si l'inhibition de la synthèse de (glyco)sphingolipides, d'importants constituants des radeaux lipidiques, détient une influence sur la captation sélective. Pour se faire, nous avons incubé des cellules HepG2 pendant 24 h en présence de myriocine, un inhibiteur de la sérine-palmitoyl transférase (**Figure 13**), l'enzyme formant le premier précurseur des glycosphingolipides et des sphingolipides, soit le céramide. Les résultats montrent que l'association lipidique ainsi que la captation sélective des LDL et HDL<sub>3</sub> ne diffèrent pas (ou peu) chez les cellules ainsi traitées en comparaison de cellules contrôles (**Figure 14**). Cependant, la myriocine a diminué l'association protéique des LDL et a réduit de façon significative la dégradation des LDL, suggérant que l'internalisation du rLDL dépend d'un produit de la voie de biosynthèse des sphingolipides.

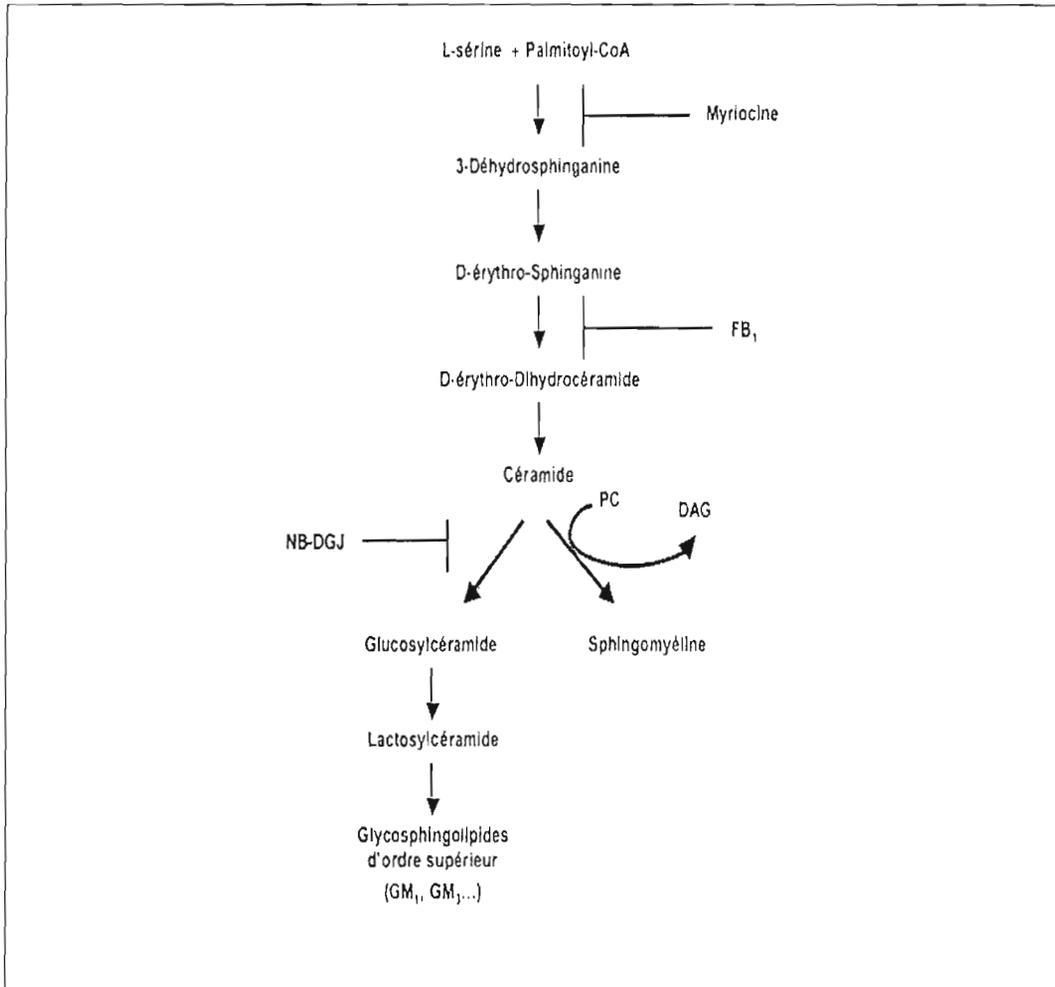


Figure 13: Voie de synthèse des (glyco)sphingolipides. Adaptée de Cheng et al., 2006.

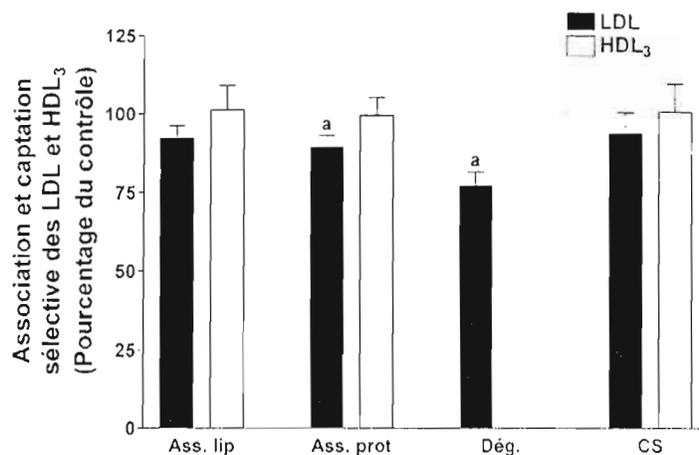
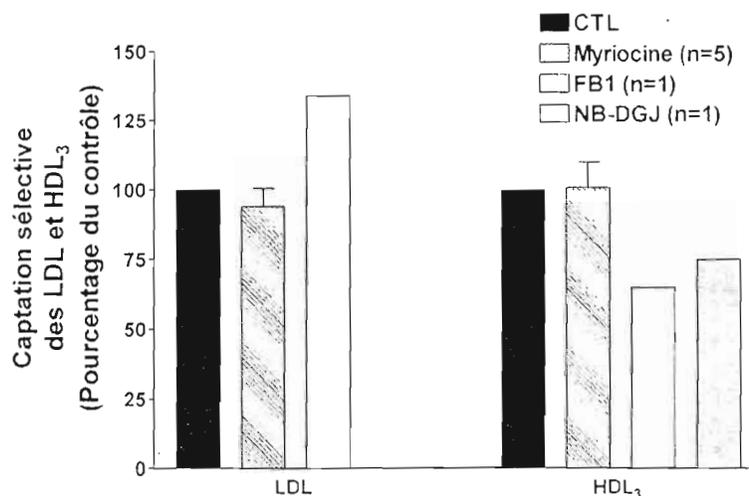


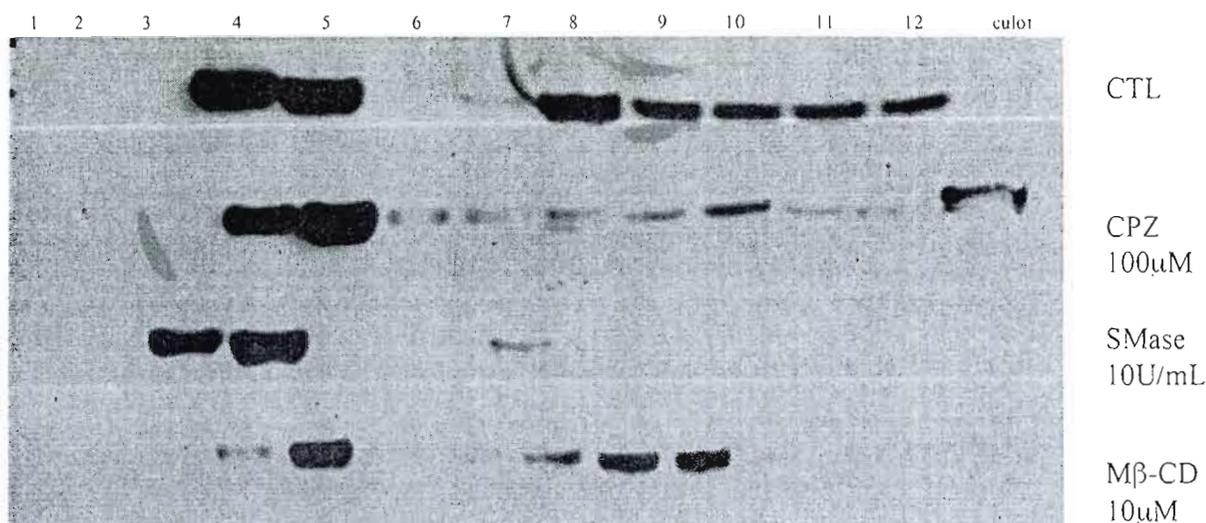
Figure 14: Effet de la myriocine sur l'association lipidique, protéique et sur la captation sélective des EC-LDL et HDL<sub>3</sub>. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 24 h dans du MEM contenant 1 % de FBS et 10  $\mu$ M de myriocine. Les cellules ont ensuite été incubées 4 h à 37°C en présence de 20  $\mu$ g/mL de lipoprotéines radiomarquées (<sup>125</sup>I- ou <sup>3</sup>H-). a: P<0,05. Les résultats (expériences indépendantes (n=5) réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par un test de t pairé de Student.

L'incubation des cellules avec un second inhibiteur de la synthèse de ces lipides, la fumonisine B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), qui inhibe la céramide glucosyltransférase, a conduit aux mêmes résultats (Figure 15) en ce qui a trait à la captation sélective des EC-LDL et EC-HDL<sub>3</sub>. Nous avons donc utilisé ensuite un inhibiteur spécifique de la synthèse de glycosphingolipides uniquement, le NB-DGJ. Après 48h en présence de ce produit, les cellules HepG2 ont vu demeurer inchangée leur capacité à effectuer la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub> par rapport à des cellules non traitées (Figure 15).



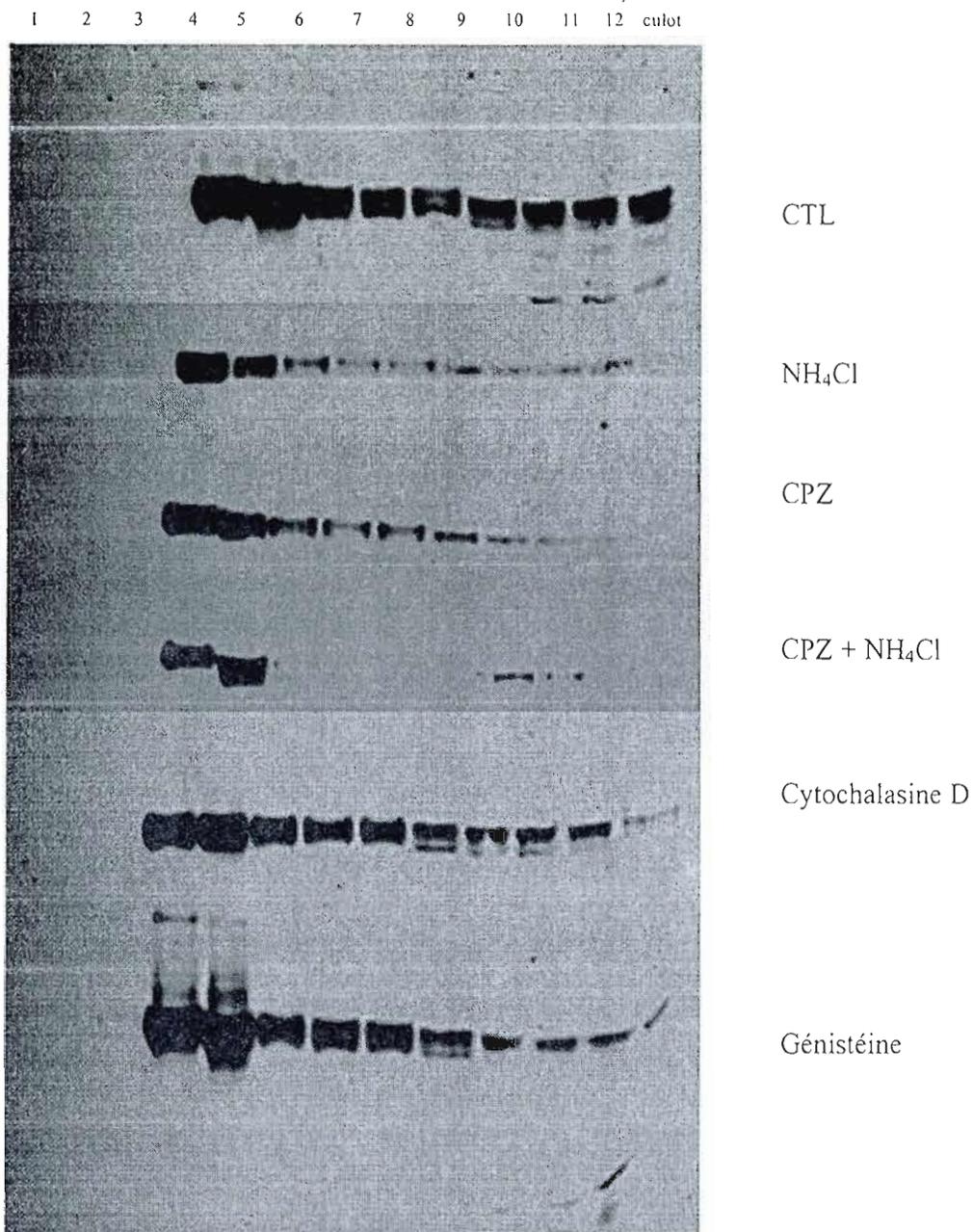
**Figure 15: Effet du FB<sub>1</sub> et NB-DGJ sur la captation sélective des LDL et HDL<sub>3</sub>.** Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 24 h dans du MEM contenant 1 % de FBS et 10  $\mu$ M de myriocine ou 48 h dans du MEM contenant 1 % de FBS et 100  $\mu$ M de NB-DGJ ou 20  $\mu$ g/mL de FB<sub>1</sub>. Les cellules ont ensuite été incubées 4 h à 37°C en présence de 20  $\mu$ g/mL de lipoprotéines (LDL ou HDL<sub>3</sub>) radiomarquées (<sup>125</sup>I- ou <sup>3</sup>H-). Les résultats (expériences indépendantes réalisées en triplicat) +/- l'écart type ont été analysés par ANOVA

Tout comme la composition membranaire importe dans les mécanismes d'endocytose, la localisation de SR-BI dans ou hors des radeaux lipidiques est aussi un facteur d'importance dans son activité à l'endroit des LDL et HDL<sub>3</sub>. En effet, Rhainds *et al.* (2004) ont montré qu'un traitement des cellules à la SMase affectait la captation sélective à partir des LDL alors qu'un traitement à la  $\beta$ -cyclodextrine l'augmentait à partir de ces deux ligands. Nous avons donc d'abord tenté de vérifier par fractionnement sur gradient de sucrose discontinu si la perturbation des radeaux lipidiques résulte en un déplacement du SR-BI vers ou hors des fractions membranaires de faible densité, c'est-à-dire les fractions 4 et 5. La **Figure 16** montre que le traitement des cellules HepG2 avec de la sphingomyélinase (SMase) semble avoir déplacé le SR-BI vers les fractions 3 et 4 (fractions de faible densité) alors que la séquestration du cholestérol membranaire à l'aide de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine a provoqué son déplacement vers les fractions 8 à 10 (fraction de haute densité).

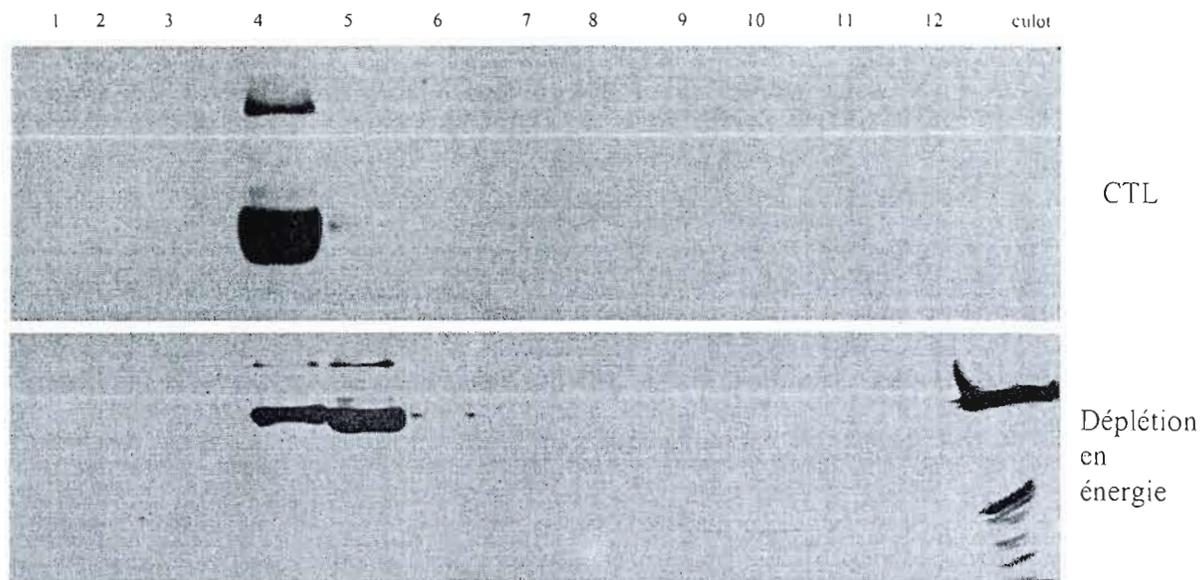


**Figure 16:** Effet de la chlorpromazine, de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine et de la sphingomyélinase (SMase) sur la localisation membranaire du SR-BI. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min à 37°C avec la chlorpromazine (CPZ) ou la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine ou 1 h avec la sphingomyélinase (SMase) puis fractionnées sur un gradient discontinu (5-40 %) de sucrose tel que décrit dans le *Matériel et méthodes*. Les protéines (50  $\mu$ L des fractions 1 à 12 puis du culot) ont été séparées sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) puis le SR-BI a été révélé par Western Blot. n=1.

Nous avons ensuite fractionné par la même méthode des cellules traitées avec du  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , de la CPZ, la combinaison  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et CPZ, de la cytochalasine D ou de la génistéine (**Figure 17**) ainsi qu'avec la privation en ATP (**Figure 18**). Les résultats indiquent que les traitements qui avaient diminué la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub> : soit le  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , la CPZ et la génistéine ont tendance à concentrer le SR-BI dans les fractions 3 à 5 alors que la cytochalasine D (**Figure 17**) et la sous-unité B de la toxine de *C. difficile* (**Figure 19**), qui augmentaient la captation sélective des EC-LDL et EC-HDL<sub>3</sub>, ne l'ont pas déplacé. Le traitement n'affectant pas la captation sélective, soit la privation en ATP (**Figure 18**), n'a pas non plus déplacé le SR-BI. Les résultats montrent aussi des bandes de plus grand poids moléculaire (environ 160 kDa) attribuables à la présence de dimères de SR-BI dans les fractions 4 et 5 de la plupart des traitements.

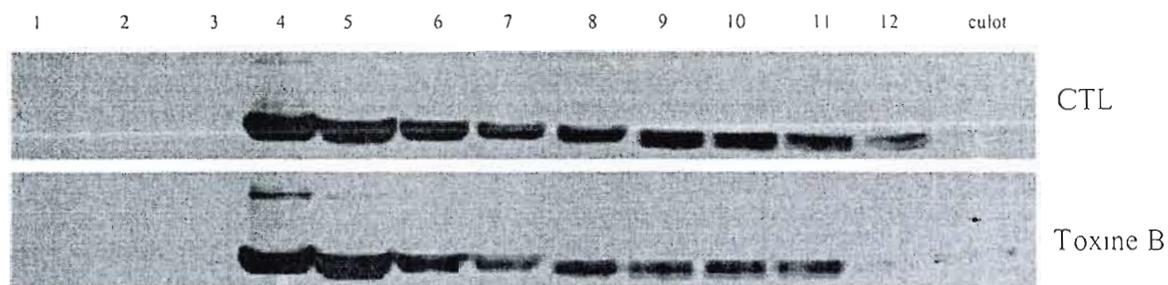


**Figure 17:** Effet des différents inhibiteurs d'endocytose sur la localisation membranaire de SR-BI. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min à 37°C en présence de 25 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 100 μM de CPZ ou une combinaison des deux, ou 100 μM de cytochalasine D ou 100 μM de génistéine puis fractionnées sur un gradient discontinu (5-40 %) de sucrose tel que décrit dans le *Matériel et méthodes*. Les protéines (50 μL des 12 fractions obtenues puis du culot) ont été séparées sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) puis le SR-BI a été révélé par Western Blot. n=1.



**Figure 18: Effet de la déplétion en énergie sur la localisation membranaire du SR-BI.** Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 30 min à 37°C avec la combinaison  $\text{NaN}_3$  (5 mM) / 2-d-désoxyglucose (50 mM) puis fractionnées sur un gradient discontinu (5-40 %) de sucrose tel que décrit dans le *Matériel et méthodes*. Les protéines (50  $\mu\text{L}$  des fractions 1 à 12 puis du culot) ont été séparées sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) puis le SR-BI a été révélé par Western Blot. n=1

Pour vérifier si l'augmentation de captation sélective observée suite à l'inhibition de l'activité des protéines de la famille de Rho était aussi attribuable à un effet sur la localisation membranaire de SR-BI, nous avons aussi déterminé sa localisation suite au traitement des cellules avec la sous-unité B de *C. difficile* (Figure 19). Après fractionnement sur gradient discontinu de sucrose, les SR-BI ne se trouvent pas déplacé dans les cellules traitées avec la sous-unité B de la toxine de *C. difficile* par rapport à sa localisation dans les cellules contrôles. Il semble toutefois légèrement plus concentré dans les fractions de plus faibles densités (4 et 5).



**Figure 19:** Effet de la toxine B de *C. difficile* sur la localisation membranaire de SR-BI. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées 2 h à 37°C avec 100 ng/mL de la toxine B de *C. difficile* puis fractionnées sur un gradient discontinu (5-40 %) de sucrose tel que décrit dans le Matériel et méthodes. Les protéines (50 µL des fractions 1 à 12 puis du culot) ont été séparées sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) puis le SR-BI a été révélé par Western Blot. n=1.

## CHAPITRE VI: DISCUSSION

Nous avons d'abord tenté de vérifier si des mécanismes d'endocytose pouvaient être responsables de la captation sélective via le SR-BI. Le **Tableau IV** récapitule la sensibilité des deux ligands aux différents traitements. Certains inhibiteurs classiques de l'endocytose ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , choc hyperosmotique) ont permis d'inhiber la captation sélective à partir des  $\text{HDL}_3$ .

Tableau IV: Récapitulatif de l'effet des inhibiteurs de l'endocytose.

TRAITEMENT	DÉGRADATION DES LDL	CAPTATION SÉLECTIVE DES EC-LDL	CAPTATION SÉLECTIVE DES EC-HDL <sub>3</sub>	LOCALISATION DU SR-BI DANS LES RADEAUX LIPIDIQUES
Sucrose	↓	↓	-	-
Privation d'ATP	↓	-	-	↓
$\text{NH}_4\text{Cl}$	↓	-	↓	Oui
CPZ	↓	↓	↓	Oui
$\text{NH}_4\text{Cl}$ +CPZ	↓	↓	↓	Oui
Cytochalasine D	↓	-	↑	Oui
Génistéine	↓	↓	↓	Oui
PP2	-	-	-	NV
Pervanadate	↓	↑	-	NV
Dynasore	↓	-	↑	NV
Dyn2-K44A	-	-	-	NV
Toxine B de <i>C. difficile</i>	↑	↑	↑	-
Myriocine	↓	-	-	NV
NB-DGJ	-	-	-	NV
$\text{FB}_1$	-	-	-	NV
SMase	NV	NV	NV	Oui
M $\beta$ -CD	NV	NV	NV	Oui

Légende: ↓ : diminution; ↑ : augmentation; - : aucun effet; NV : non vérifié; la notation «oui» indique la présence du SR-BI dans les fractions de faibles densités.

Leur effet sur la liaison des LDL à la surface cellulaire ne nous permet cependant pas d'affirmer que ces derniers affectent la captation sélective des EC-LDL. Il ressort cependant que la captation sélective des deux ligands est réalisée par un processus indépendant de l'ATP; le traitement avec la combinaison  $\text{NaN}_3$  / 2-D-désoxyglucose n'affectant pas la captation sélective. Subséquemment, nous avons observé un effet de la CPZ sur la captation sélective de ces deux ligands sans qu'elle ne réduise, elle, la liaison de l'un ou l'autre.

Conséquemment, il est possible d'affirmer que la captation sélective à partir des LDL et HDL<sub>3</sub> est permise par un ou plusieurs mécanisme(s) d'endocytose. De plus, puisque les deux ligands se comportent différemment suite aux traitements d'inhibition classique, mais de façon semblable en présence de CPZ, nous concluons que l'endocytose pourrait se faire par des processus distincts, mais que ces voies convergent éventuellement. Les résultats préliminaires d'hydrolyse en présence de CPZ appuient l'idée d'une convergence des deux voies, puisque cette dernière est aussi efficace que la chloroquine et le NH<sub>4</sub>Cl pour inhiber l'hydrolyse acide des EC. La sensibilité à la CPZ suggère aussi l'existence d'une voie d'endocytose ne dépendant pas de la clathrine pour réguler la captation sélective. Nous y reviendrons.

Étant donné qu'il était impossible à ce stade de se prononcer sur l'existence d'une voie propre aux LDL, nous avons ensuite cherché à déterminer s'il existait réellement plus d'une voie d'endocytose régulant l'activité de captation sélective de SR-BI. Pour caractériser davantage ce ou ces mécanismes, nous avons traité les cellules à la cytochalasine D. Il est en effet rapporté dans la littérature que les voies d'endocytose, qu'elles dépendent ou non de la clathrine, ont besoin des filaments d'actine pour se dérouler normalement (Durrbach *et al.*, 1996). Les augmentations de captation sélective obtenues en présence de cytochalasine D, pour les deux ligands, suggèrent deux choses: 1) un renforcement de l'argumentation en faveur d'une voie commune pour la captation sélective des LDL et HDL<sub>3</sub>; 2) une régulation négative de la captation sélective par un mécanisme d'endocytose.

À première vue, l'ensemble de ces résultats concernant les HDL<sub>3</sub> contredit en partie certaines études récentes. En effet, contrairement à ce qui a été montré dans la plus récente et complète de ces études (Zhang *et al.*, 2007), nous observons que la privation en énergie cellulaire par le traitement avec la combinaison NaN<sub>3</sub>/2-D-désoxyglucose ne réduit pas l'association en EC-HDL<sub>3</sub>, malgré une légère baisse non significative. Dans cette même étude, les auteurs remarquent une diminution de l'association lipidique en provenance des HDL suite à un traitement hypertonique au sucre ou à la cytochalasine D. Nous montrons ici un effet similaire suivant le traitement au NH<sub>4</sub>Cl et une tendance dans le même sens suivant le choc

hyperosmotique ainsi qu'une augmentation de l'association en EC-HDL<sub>3</sub> suivant le traitement à la cytochalasine D. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette divergence d'avec l'étude menée par Zhang *et al.* En effet, le modèle expérimental de cette dernière diffère du nôtre de plusieurs façons: 1) Un autre type cellulaire, les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) déficientes en rLDL ont été utilisées; 2) les cellules utilisées ont été transfectées pour surexprimer le SR-BI; 3) les valeurs d'association obtenues résultent d'essais effectués sur 2 heures plutôt que sur quatre; 4) l'association lipidique représente des valeurs d'association d'un traceur fluorescent des lipides (le DiI), similaire aux phospholipides et non aux esters de cholestérol et 5) il n'est pas précisé quelle sous-classe de HDL est utilisée, ce qui complique l'interprétation qu'on doit faire de ces résultats. Néanmoins, l'effet du NH<sub>4</sub>Cl sur la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub> observé ici, et possiblement celui de la CPZ, indique qu'une voie dépendante de la clathrine régulant l'activité du SR-BI n'est pas à exclure. Notons qu'une analyse générale des résultats de l'étude menée par Zhang *et al.* (2007) permet d'arriver aux mêmes conclusions: l'existence d'une régulation par voie dépendante de la clathrine lors de l'internalisation des EC-HDL. Nous ne sommes pas les seuls à présumer de la dépendance à la clathrine lors de l'internalisation des HDL via les SR-B. En effet, sur l'unique base d'une sensibilité à la privation en potassium, certains ont affirmé (Eckhardt *et al.*, 2006) que dans des cellules CHO l'endocytose de HDL<sub>3</sub> via le SR-BII murin était dépendante de la clathrine. Aucune de ces études – la nôtre ne fait pas exception – n'a cependant investigué en profondeur le rôle réel de la clathrine dans l'endocytose des SR-B. L'emploi d'un petit ARN interférant ciblant la chaîne lourde de la clathrine pourrait permettre d'éclaircir ce rôle. Nous y reviendrons plus loin. Concernant l'effet des inhibiteurs classiques de l'endocytose sur la captation sélective de EC-LDL, nous ne pouvons toujours pas déterminer si elle dépend d'une inhibition de l'endocytose ou d'une diminution de la liaison des LDL à la surface cellulaire.

Étant donné qu'il avait déjà été montré par nous que la surexpression de Cav-1 dans les cellules HepG2 conduisait à une diminution de la captation sélective des EC-LDL et une augmentation de celle à partir des HDL<sub>3</sub> (Truong *et al.*, 2006), nous avons testé la possibilité que la captation sélective se produise par endocytose via un cavéosome. L'emploi d'inhibiteur de cette voie, le PP2, n'a pas affecté la captation sélective des deux ligands alors

qu'un inhibiteur plus général de PTK, la génistéine, a provoqué une diminution significative dans les deux cas. Les résultats négatifs obtenus avec les cellules surexprimant la Cav-1 (Cav13) en présence de ces mêmes inhibiteurs confirment que la voie cavéolaire est définitivement à exclure. L'effet de la génistéine suggère cependant qu'une voie d'endocytose indépendante de la clathrine pourrait réguler la captation sélective des EC-LDL et EC-HDL<sub>3</sub>. Cependant, nous observons aussi une inhibition de la dégradation des LDL en présence de génistéine et cet effet est potentialisé par l'ajout de PP2. Ceci indique que l'endocytose dépendante de la clathrine ne peut toujours pas être exclue pour expliquer la captation sélective d'un ou l'autre des deux ligands.

Puisque nous suggérons l'existence de plus d'une voie d'endocytose régulant la captation sélective des LDL et HDL<sub>3</sub>, nous avons ensuite voulu caractériser ces mécanismes sur la base de leur dépendance à la Dyn-2, une GTPase essentielle à l'endocytose dépendante de la clathrine et à celle régulée par RhoA. Nous avons donc testé l'effet du dynasore, un inhibiteur pharmacologique de la Dyn-2, pour trouver qu'il augmentait de façon significative la captation sélective des HDL<sub>3</sub>, mais pas celle des LDL, bien qu'une tendance à l'augmentation puisse être observée. De concert avec les résultats de captation sélective obtenus suite aux traitements à la CPZ et inhibiteurs classiques de l'endocytose, ceci permet d'affirmer que le SR-BI se comporte réellement de façon différente face aux LDL et HDL<sub>3</sub>: la captation sélective des premières se faisant probablement par un mécanisme indépendant de la clathrine, les secondes, l'inverse.

Jusqu'ici, nous avons traité la CPZ, à notre convenance, à la fois pour appuyer nos résultats en faveur d'une captation sélective régulée par une voie dépendante de la clathrine dans le cas des EC-HDL<sub>3</sub> et en faveur d'une voie indépendante de la clathrine dans le cas des EC-LDL. Puisque la CPZ est typiquement associée à l'inhibition de l'endocytose dépendante de la clathrine, il est important de préciser notre raisonnement. Notons d'abord que notre présomption de l'effet de la CPZ sur l'endocytose indépendante de la clathrine repose sur plusieurs observations. En effet, dans un important article concernant les voies d'endocytose indépendantes de la clathrine (Cheng *et al.*, 2006), on remarque que la CPZ réduit

l'internalisation du récepteur à l'interleukine-2 d'environ 35%. De plus, il est connu que la CPZ modifie la composition membranaire en s'intercalant entre les lipides de la portion interne de la bi-couche (Sheetz et Singer, 1974) provoquant ainsi la formation d'invagination de la membrane cellulaire. Il a aussi été montré que les drogues cationiques amphiphiles (comme la CPZ) lorsque employées à des ratios drogue:lipide élevés se comportent comme des détergents et perturbent l'intégrité membranaire (King *et al.*, 1989). Aussi, une étude physico-chimique menée récemment (Tessier *et al.*, 2008) par diffraction de rayons X sur des membranes synthétiques montre que la CPZ provoque un changement de la phase liquide ordonnée ( $L_o$ ) des domaines riches en PC, SM et cholestérol vers la phase désordonnée ( $L_d$ ) réduisant ainsi l'hétérogénéité des domaines membranaires. Les expériences préliminaires de fractionnement sur gradient discontinu de sucrose effectuées ici suggèrent que les traitements affectant la composition membranaire comme la SMase pourraient déplacer le SR-BI vers les fractions de faible densité, ce qui est aussi montré pour la CPZ, concordant ainsi avec la littérature. Il peut paraître contradictoire que les traitements favorisant la transition de la phase  $L_o$  vers la phase  $L_d$  produisent un enrichissement des raieaux lipidiques en SR-BI. Cependant, l'existence de différents microdomaines à la membrane pourrait expliquer ce phénomène. En en altérant un type on favoriserait la localisation du SR-BI dans un autre. Slimane *et al.*, 2003 ont d'ailleurs montré ce phénomène dans des cellules HepG2 soumise à un traitement provoquant la déplétion en cholestérol membranaire. En effet, ce traitement a provoqué une augmentation de la solubilité au Triton X-100 sans modifier la localisation apicale d'une protéine à ancrage de GPI alors qu'il produisait en même temps la relocalisation basolatérale d'une autre protéine. La solubilité au Lubrol WX, un autre détergent, demeurait cependant inchangée. La cohérence entre-eux des résultats obtenus ici invite, d'une part, à refaire ces expériences de fractionnement et à quantifier ce qui semble être un déplacement. Ce sont en effet des expériences qui n'ont pas été réalisées plus d'une fois. Les résultats invitent, d'autre part, à vérifier par microscopie à fluorescence la localisation du SR-BI suivant ces différents traitements ou encore à tester la solubilité du SR-BI à différents types de détergent. Ceci-dit, il est clair que la CPZ dispose de plusieurs modes d'action et ne devrait pas être utilisée pour déduire d'une seule dépendance à la clathrine. Ainsi, bien qu'il faudrait approfondir notre connaissance des effets de la CPZ dans notre système, nous demeurons convaincus que notre analyse est valide et que cette drogue peut

inhiber plus d'un type d'endocytose. Les résultats pourraient donc très bien indiquer que la CPZ agit comme un inhibiteur de l'endocytose dépendante de la clathrine pour les HDL<sub>3</sub>, mais pas pour les LDL. Nous ne pouvons cependant passer sous silence l'existence d'effets de la CPZ indépendants de l'endocytose ou de la composition membranaire et qui sont rapportés dans la littérature. D'abord, appuyant notre analyse, Wang *et al.* (1993) ont constaté que cette drogue empêchait dans des fibroblastes la formation du puits tapissé de clathrine tout en promouvant son assemblage au niveau des membranes endosomales, appuyant l'hypothèse d'une altération du trafic de la voie dépendante de la clathrine. Il existe aussi des effets secondaires à la CPZ. Ainsi, une étude (Fernø *et al.*, 2006) a montré que dans une lignée de cellules gliales, la CPZ (ainsi que d'autres composés psychotropes) employée à de faibles concentrations (0 à 25 µM) provoquait le clivage de SREBP2 et conduisait à l'expression de gènes liés à la lipogenèse notamment l'HMGCoAred et le rLDL. À des concentrations supérieures (100 µM), Adams *et al.* (2003) ont montré, qu'à la façon du cholestérol, la CPZ induisait chez la protéine SCAP le changement de conformation nécessaire pour induire une rétention de SREBP dans le RE. La diminution de captation sélective que nous observons ici pourrait donc aussi être le résultat d'une régulation indirecte de métabolisme du cholestérol compensant pour le mimétisme de la CPZ, mais il n'est cependant pas envisageable qu'un effet transcriptionnel de la CPZ soit observé en seulement 4 heures. Puisqu'il a été montré par microscopie à fluorescence que la CPZ provoquait aussi dans les fibroblastes une redistribution du rLDL vers l'intérieur de la cellule (Wang *et al.*, 1993) et que nous avons précédemment montré que dans les cellules HepG2 on localisait la chaîne lourde de clathrine (Rhainds *et al.*, 2004) et le rLDL (Truong *et al.*, 2006) dans les fractions de faible densité, il nous faudrait vérifier la localisation membranaire de ces deux protéines suite au traitement à la CPZ et, advenant une modification, l'implication de ces dernières lors de la captation sélective. Il ne serait pas surprenant de montrer que la voie d'endocytose dépendante de la clathrine puisse aussi être dépendante des radeaux lipidiques dans les cellules HepG2. Ceci pourrait expliquer pourquoi la captation sélective est sensible à des traitements communs pour les EC-LDL et EC-HDL<sub>3</sub>. Nous rappelons que nous avons précédemment montré (Rhainds *et al.*, 2004) que la perturbation des radeaux lipidiques diminuait la dégradation des LDL, ce qui est aussi rapporté ici, bien que de façon préliminaire, avec la CPZ et la myriocine. Aussi, nous avons montré que la captation

sélective des deux ligands était sensible à la génistéine et donc à l'activité des PTK. Dans plusieurs modèles cellulaires (CHO et HeLa) cet effet est considéré comme un signe de la dépendance à une voie dépendante des radeaux lipidiques. Le traitement à la génistéine a aussi réduit la dégradation des LDL et semble avoir déplacé une fraction de SR-BI dans les fractions de faible densité, renforçant l'hypothèse d'une sensibilité commune des voies dépendantes et indépendantes de la clathrine dans notre modèle.

Les LDL pourraient donc être internalisées par un mécanisme dépendant des radeaux lipidiques, mais non de la clathrine, mais nous considérons qu'il est essentiel d'approfondir nos connaissances de l'implication de la clathrine avant de conclure. L'effet d'un petit ARN interférant (siRNA) ciblant la chaîne lourde de clathrine ou de la transfection des cellules HepG2 avec un dominant négatif d'EPS15 sur la captation sélective à partir des deux ligands permettrait de confirmer que la clathrine est essentielle pour la CS des EC-HDL et non pour celles des EC-LDL.

De plus, il est aussi essentiel de préciser le rôle de la dynamine dans la captation sélective, car nous présentons ici des résultats qui ne semblent pas cohérents les uns avec les autres en ce qui concerne le rôle de cette GTPase. En effet, si le dynasore a montré une tendance à l'augmentation de la captation sélective des EC-LDL, l'expression de la dynamine-2<sup>K44A</sup>, semble indiquer une tendance à la diminution. De plus, ces deux moyens de vérifier l'implication de la dynamine dans la captation sélective des HDL<sub>3</sub> conduisent à des résultats contradictoires. En effet, le dynasore a promu la captation sélective via une augmentation de l'association lipidique aux dépens de l'association protéique des HDL<sub>3</sub> alors que l'expression de la dynamine 2 mutante n'a eu d'effet significatif que sur l'augmentation de l'association protéique. Il est impossible d'expliquer ces contradictions sans remettre en question soit l'une ou l'autre des deux méthodes employées et une explication possible de cette disparité réside dans l'emploi que nous avons fait du dynasore. Bien qu'il ait été utilisé à des concentrations qui inhibent bien l'internalisation et le recyclage de la transferrine ainsi que la dégradation des LDL, il est possible que son effet sur la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub> soit plutôt un artefact de la non-spécificité du produit qui aurait été induite par une trop grande

concentration. La littérature donne de précieux exemples d'utilisation du dynasore à des concentrations plus faibles et suivant une pré-incubation plus longue. En effet, Poirier *et al.* (2009), avec des cellules HepG2 aussi, ont privilégié l'emploi d'une concentration cinq fois moindre pendant une période huit fois plus grande que celle employée ici pour parvenir à une inhibition de l'internalisation de DiI-LDL. Aussi, dans une étude menée sur des cellules de Sertoli TM4 les auteurs ont plutôt préconisé l'emploi d'une concentration dix fois inférieure sur une période douze fois plus grande de pré-incubation par rapport à ce qui a été réalisé ici pour parvenir à une diminution d'environ 66% de la phagocytose (Otsuka *et al.*, 2009). Ces conditions d'utilisation du dynasore ont été testées (non montré) et n'ont cependant pas permis d'inhiber le recyclage ou l'internalisation de la  $^{125}\text{I}$ -transferrine. Il serait donc tentant de pencher en faveur des résultats obtenus avec l'expression de la dynamine-2<sup>K44A</sup> pour brosser un portrait juste de la régulation des voies empruntées lors de la captation sélective. Notons cependant deux facteurs d'importance nous obligeant plutôt à invalider les résultats obtenus avec ce mutant: 1) l'efficacité de transfection n'a pas été vérifiée et le nombre de réplicats obtenus (n=3) par cette méthode ne nous permet pas de bénéficier d'une grande puissance statistique; 2) l'expression du mutant n'a pas permis de diminuer la dégradation des  $^{125}\text{I}$ -LDL, contrairement au dynasore, ce qui suggère que la méthode d'inhibition n'est pas du tout valide. Néanmoins, les résultats actuels nous permettent de confirmer qu'il est juste de vérifier l'implication de la clathrine dans la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub>. Ceci confirmerait les résultats montrant un effet du NH<sub>4</sub>Cl et de la CPZ sur l'activité du SR-BI envers les HDL<sub>3</sub>, s'accordant avec les autres exemples dans la littérature citée plus haut.

Nous avons montré ici que plus d'un mécanisme d'endocytose pourrait influencer la captation sélective des EC-LDL et EC-HDL<sub>3</sub>, et ce de façon différente en fonction de chacun des deux ligands. Ainsi, il se dégage de l'expérimentation que la captation sélective des EC-LDL est insensible aux inhibiteurs classiques de l'endocytose dépendante de la clathrine, qu'elle est peut-être régulée négativement par la dynamine. Cette régulation dépend cependant d'un processus affecté par la CPZ et la génistéine. En ce qui concerne la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub>, nous démontrons ici qu'elle est sensible à l'acidification du cytosol et à la CPZ; probablement régulée négativement par la dynamine; et qu'elle nécessite

l'activation de PTK. La captation sélective des EC-LDL et celle des EC-HDL<sub>3</sub> sont toutes deux indépendantes de l'ATP.

Puisque des mécanismes d'endocytose semblent réguler la captation sélective, l'indépendance à l'ATP suggère que des protéines activées par leur liaison au GTP pourraient, elles, la réguler. Ainsi, les résultats obtenus avec la sous-unité B de la toxine de *C. difficile*, qui inhibe à la fois RhoA et Cdc42, appuient une régulation de cette sorte. En effet, l'augmentation de captation sélective observée pour les EC-HDL<sub>3</sub> concorde avec les résultats obtenus en présence de dynasore, renforçant une régulation négative par un mécanisme d'endocytose régulé par RhoA, lequel est traditionnellement dépendant de la dynamine. En ce qui concerne l'augmentation de captation sélective des EC-LDL en présence de ce traitement, ils vont dans le même sens: il y a possibilité d'une régulation négative par une GTPase qui serait RhoA ou Cdc42. Cependant nous devons demeurer prudent avant d'avancer qu'il s'agit de l'une ou l'autre: la confirmation d'un rôle de la dynamine étant essentielle pour départager une voie dépendant de RhoA d'une voie dépendant de Cdc42.

L'effet d'augmentation de la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub> en présence d'inhibiteurs pharmacologiques de la dynamine et des protéines de la famille de Rho suggère que la captation sélective est régulée négativement par un mécanisme d'endocytose, c'est-à-dire que l'endocytose de SR-BI, si elle était dynamine et RhoA dépendante, nuirait à la captation sélective. Cette interprétation est renforcée par l'augmentation de la captation sélective observée suite au traitement à la cytochalasine D, puisque ces deux voies ont besoin des filaments d'actine. Cependant, l'existence d'une voie régulée par RhoA dans les cellules HepG2 n'exclut pas que l'endocytose de SR-BI puisse être régulée par un autre mécanisme et que les effets de ces inhibiteurs sur la captation sélective résultent d'autres événements que de l'inhibition de la voie qu'emprunte le SR-BI; un transfert de la voie régulée par RhoA vers la voie dépendante de la clathrine par exemple. L'existence d'une telle voie est bien réelle dans les cellules HepG2. Ainsi, Malaval *et al.* (2009) ont récemment montré que l'activité de RhoA et de ses effecteurs contrôlait l'endocytose des HDL via la liaison de l'apoAI à un autre récepteur que le SR-BI, la F(1)-ATPase. Il s'agit cependant ici d'un site de liaison de

très haute affinité (Garcia *et al.*, 1996) (résultant en une internalisation de 5 ng de HDL/mg de protéines cellulaires) dont l'importance n'est que minime aux concentrations de lipoprotéines employées ici pour les essais d'association. Le transfert évoqué plus haut n'a donc rien à voir avec cette liaison des HDL à la F(1)-ATPase, mais nous évoquons plutôt la possibilité que le SR-BI lui-même se déplace ou emprunte plus d'une voie. Jusqu'ici, nous avons présumé de l'implication de RhoA en raison de la dépendance à la dynamine, mais la sous-unité B de la toxine de *C. difficile* inhibe à la fois l'activité régulatrice de RhoA et de Cdc42 et il devient essentiel de tester les dominants négatifs de ces deux protéines pour réellement départager les deux voies.

Puisque les voies indépendantes de la clathrine sont régulées par la composition lipidique de la membrane cellulaire (Cheng *et al.*, 2006), nous avons ensuite pavé la voie à une interprétation qui serait plutôt faite sur la base de la localisation membranaire du SR-BI. En effet, nous montrons que les différentes voies d'endocytose empruntées par le SR-BI sont en partie régulées par sa présence dans les radeaux lipidiques. Par fractionnement des cellules traitées sur gradient discontinu de sucrose, nous avons tenté d'expliquer l'effet des différents traitements sur cette base. Nous montrons ici que la SMase semble concentrer le SR-BI dans les radeaux lipidiques. Rhainds *et al.* (2004) avaient déjà montré qu'en perturbant ainsi l'intégrité membranaire, on réduisait la captation sélective des EC-LDL et augmentait celle des EC-HDL<sub>3</sub>. Nos résultats sont en partie en accord avec ce qui a été démontré par cette étude. Nous constatons en effet, comme Rhainds *et al.* (2004), que les traitements qui semblent concentrer le SR-BI dans les fractions de faible densité comme le NH<sub>4</sub>Cl, la CPZ et la génistéine, réduisent ou tendent à réduire la captation sélective des EC-LDL. Cependant ce même déplacement vers les fractions de faible densité a aussi comme effet de diminuer la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub> contrairement à l'augmentation observée par ces auteurs. Cette même étude montrait que l'extraction du cholestérol membranaire à la  $\beta$ -cyclodextrine augmentait la captation sélective et des EC-LDL et des EC-HDL<sub>3</sub>. Nous avons ici employé la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine et montré qu'elle apparaît déplacer le SR-BI hors des radeaux lipidiques. Contrairement à eux, la redistribution du SR-BI vers les fractions de plus haute densité (par privation des cellules en énergie et par l'ajout de cytochalasine D) n'affecte pas l'efficacité de la captation sélective des EC-LDL ou tend seulement à l'augmenter alors

qu'elle diminue celle des EC-HDL<sub>3</sub>. Il est important de mentionner que les inhibiteurs d'endocytose employés pour notre étude, à l'exception de la CPZ dont nous avons parlé plus tôt, n'ont pas la capacité d'influencer directement, comme le font la SMase et la  $\beta$ -cyclodextrine, la composition de la membrane cellulaire. Ceci suggère un effet indirect de nos traitements et rend difficile, et peut-être inappropriée, la comparaison avec l'étude de Rhainds *et al* (2004). De plus, plusieurs facteurs semblent indiquer que la localisation membranaire de SR-BI ne puisse, à elle seule, suffire à expliquer son activité. D'abord, il est maintenant connu que le maintien du SR-BI à la surface cellulaire et son activité envers les HDL sont permis par la liaison à son extrémité C-terminale d'une protéine chaperonne: PDZK1 (Fenske *et al.*, 2009). Il n'est pas à exclure que les traitements employés ici, en déplaçant le SR-BI, modifient aussi l'association du SR-BI à cette protéine. Ensuite, il est connu que le SR-BI, en plus de lier les lipoprotéines, est aussi le récepteur du virus de l'hépatite C (HCV) (Scarselli *et al.*, 2002), et ce grâce à plusieurs autres co-récepteurs notamment CD81 (Pileri *et al.*, 1998), une protéine à quatre domaines transmembranaires (tétraspanine) appartenant à des domaines membranaires particuliers. L'entrée du HCV serait non seulement facilitée par la présence de HDL (Bartosch *et al.*, 2005) mais, une étude très intéressante menée par Kapadia *et al.* (2007) révèle même que le traitement à la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine réduit l'expression de CD81 sans affecter celle de SR-BI tout en empêchant les cellules hépatiques d'être infectées par le HCV. Puisque nous montrons la possibilité d'une voie indépendante de la dynamine et de la clathrine lors de la captation sélective des EC-LDL, le rôle des tétraspanines dans la captation sélective mérite aussi d'être étudié dans notre modèle. Le rôle de la flotilline devrait aussi être étudié. D'autant plus qu'il a récemment été identifié dans les cellules HepG2, une voie d'internalisation de certaines protéines à partir de la membrane basolatérale qui est effectuée par un mécanisme indépendant de la dynamine et de Cdc42, mais dépendant de la flotilline-2 (Aït-Slimane *et al.*, 2009). De plus, CD81 appartient aux protéines de la famille des tétraspanines et pourrait jouer un rôle dans l'endocytose tel que supporté par des études réalisées sur d'autres protéines appartenant à cette famille. Entre autres, Xu *et al.* (2009) ont récemment montré que CD82 était conduit vers les endosomes et lysosomes via une voie d'endocytose indépendante de la dynamine et de la clathrine, dépendante de la flotilline et de la présence de cholestérol membranaire. L'expression de CD82 avait déjà présenté la capacité de relocaliser le récepteur à l'EGF dans

les radeaux lipidiques et de réguler sa dimérisation, empêchant ainsi son internalisation (Odinstova *et al.*, 2003). De leur côté, Liu *et al.* (2007) ont montré que la tetraspanine CD151 permettait l'endocytose nécessaire à la migration cellulaire des intégrines. Le rôle de CD81 et PDZK1 dans l'activité de captation sélective de SR-BI devrait donc être précisé. Ceci pourrait se faire par immunobuvardage de type western à la suite du fractionnement sur gradient discontinu de sucrose des cellules traitées avec les inhibiteurs ou encore par une sous-expression de ces protéines à l'aide de petits ARN interférants (siRNA). En somme, il nous est impossible d'expliquer les résultats obtenus ici sur une base qui ne tient strictement compte que de la localisation membranaire du SR-BI. Néanmoins, la vérification de l'emplacement membranaire du SR-BI suite aux autres traitements, notamment le dynasore, pourrait permettre de réconcilier les résultats contradictoires exposés ici.

Rappelons aussi que la dépendance au cholestérol membranaire sert habituellement à distinguer entre les voies d'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine, les voies indépendantes de la clathrine étant sensibles à la privation membranaire en cholestérol. En admettant que plus d'une voie puissent réguler la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub>, l'augmentation de captation sélective observée suite au traitement à la  $\beta$ -cyclodextrine par Rhainds *et al.* (2004) pourrait bien appuyer notre hypothèse d'un transfert d'une voie vers une autre lors de l'inhibition d'une voie d'endocytose. L'inhibition de voies indépendantes de la clathrine résulterait ici en une augmentation de l'importance de la voie dépendante de la clathrine responsable de la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub>. Des exemples de ce type de transfert ou de régulation croisée entre les différentes voies d'endocytose sont de plus en plus fréquents dans la littérature. En effet, il a été montré (Kasprowicz *et al.*, 2008) que l'inhibition de la voie clathrine dépendante chez *D. melanogaster* provoquant une diminution du recyclage synaptique augmentait du même coup l'internalisation de la phase fluide attribuable au *turnover* membranaire. Nous ne pouvons cependant pas exclure que l'augmentation de captation sélective à partir des deux ligands du SR-BI en présence de  $\beta$ -cyclodextrine observée par Rhainds *et al.* (2004) ne soit pas plutôt causée par une augmentation de la liaison des lipoprotéines à la surface cellulaire que par la sensibilité des voies d'endocytose à la composition membranaire. Dans ce modèle, la composition membranaire influencerait la présentation par le SR-BI de certains sites de liaison plus

favorables à son activité envers les lipoprotéines. C'est d'ailleurs la conclusion à laquelle arrivent les auteurs et une interprétation évoquée par d'autres concernant des ligands comme l'interleukine-2 (Cheng *et al.*, 2006) ou la toxine du choléra (Kirkham *et al.*, 2005). La liaison à 4°C des LDL et HDL<sub>3</sub> à la surface cellulaire des cellules traitées à la cyclodextrine ou à la SMase mériterait d'être vérifiée pour clarifier ce point. Il est aussi vrai que les augmentations de captation sélective obtenues en présence de cyclodextrine par Rhains *et al.* (2004) peuvent être attribuable à une diminution dans le gradient de concentration de cholestérol entre la lipoprotéine et la membrane cellulaire. Cependant cette même étude rapporte que la séquestration du cholestérol membranaire par la filipine III ne produit pas cette augmentation de la CS des EC-HDL<sub>3</sub>. La teneur membranaire en cholestérol ne saurait donc expliquer seule les effets observés.

## 7- CONCLUSION

Bien qu'il demeure plusieurs ambiguïtés quant aux voies d'endocytose qu'emprunte le SR-BI, notre étude a montré que de telles voies étaient impliquées et a raffiné suffisamment leurs spécificités pour pouvoir identifier les derniers éléments permettant de les caractériser rapidement. En effet, la sensibilité aux inhibiteurs de la voie clathrine dépendante de la captation sélective des EC-HDL<sub>3</sub> et son augmentation en présence d'inhibiteurs des autres voies, nous permettent de suggérer qu'il devrait s'agir d'une voie dépendante de la clathrine. Pour ce qui est de la captation sélective des EC-LDL, les résultats pointent vers une voie indépendante de la clathrine possiblement régulée par RhoA, Cdc42 ou la flotilline.

## BIBLIOGRAPHIE

- ACTON, S.L., P.E. Scherer, F.H. Lodish et M. Krieger (1994) *Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor*, J. Biol. Chem. 269: 21003-21009.
- ACTON, S.L., A. Rigotti, K.T. Landschulz, S. Xu et H. Hobbs (1996) *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*, Science 271: 518-520.
- ADAMS, C.M., J.L. Goldstein et M.S. Brown (2003) *Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 10647-10652.
- AISEN, P. (2004) *Transferrin receptor 1*, Int. J. Biochem. Cell Biol. 36: 2137-2143.
- AÏT-SLIMANE, T., R. Galmes, G. Trugnan et M. Maurice (2009) *Basolateral internalization of GPI-anchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells*, Mol. Biol. Cell 20: 3792-3800.
- ANDERSON G.J., D. Darshan, S.J. Wilkins et D.M. Frazer (2007) *Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand*, Biometals 20: 665-674.
- ANDERSON, R.G., J.L. Goldstein et M.S. Brown (1977) *A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts*, Nature 270: 695-699.
- AOKI, T., R. Nomura et T. Fujimoto (1999) *Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium*, Exp. Cell Res. 253: 629-636.
- ARAI, T., N. Wang, M. Bezouevski, C. Welch et A.R. Tall (1999) *Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene*, J. Biol. Chem. 274: 2366-2371.
- ASCHENBRENNER, L., S. Naccache et T. Hasson (2004) *Uncoated endocytic vesicles require the unconventional myosin, Myo6, for rapid transport through actin barriers*, Mol. Biol. Cell 15: 2253-2263.
- BABITT, J., B. Trigatti, A. Rigotti, E.J. Smart, R.G. Anderson, S. Xu et M. Krieger (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.
- BARTOSCH, B., G. Verney, M. Dreux, P. Donot, Y. Morice, F. Penin, J.M. Pawlotsky, D. Lavillette et F.L. Cosset (2005) *An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis*

*C* virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies, *J. Virol.* 79: 8217-8229.

-BENMERAH, A., C. Lamaze, B. Bègue, S.L. Schmid, A. Dautry-Varsat et N. Cerf-Bensussan (1998) *AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis*, *J. Cell Biol.* 140: 1055-1062.

-BERDITCHEVSKI, F., E. Odintsova, S. Sawada et E. Gilbert (2002) *Expression of the palmitoylationdeficient CD151 weakens the association of  $\alpha 3\beta 1$  integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling*, *J. Biol. Chem.* 277: 36991-37000.

-BERLINER, J.A., M.C. Territo, A. Sevanian, S. Ramin, J.A. Kim, B. Bamshad, M. Esterson et A.M. Fogelman (1990) *Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions*, *J. Clin. Invest.* 85: 1260-1266.

-BLANCHE, P.J., E.L. Gong, T.M. Forte et A.V. Nichols (1981) *Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis*, *Biochim. Biophys. Acta* 665: 408-419.

-BRECKENRIDGE, W.C., J.A. Little, G. Steiner, A. Chow et M. Poapst (1978) *Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II*, *New Engl. J. Med.* 298: 1265-1273.

-BRIGGS, M.R., C. Yokoyama, X. Wang, M.S. Brown et J.L. Goldstein (1993) *Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence*, *J. Biol. Chem.* 268: 14490-14493.

-BRISSETTE, L. et L. Falstrault (1994) *Analysis of the selective uptake of the cholesteryl ester of human intermediate density lipoproteins by HepG2 cells*, *Biochim. Biophys. Acta* 1213: 5-13.

-BRISSETTE, L., M.C. Charest et L. Falstrault (1996) *Selective uptake of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein binding site and is followed by hydrolysis of the cholesteryl esters*, *Biochem. J.* 318: 841-847.

-BRISSETTE, L., P.D. Roach et S.P. Noël (1986) *The effect of liposome-reconstituted apolipoprotein on the binding of rat intermediate density lipoprotein to rat liver membranes*, *J. Biol. Chem.* 261: 11631-11638.

-BRODEUR, M.R., V. Luangrath, G. Bourret, L. Falstrault et L. Brissette (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.

- BRODSKY, F.M., C.Y. Chen, C. Knuehl, M.C. Towler et D.E. Wakeham (2001) *Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 517-568.
- GOLDSTEIN, J.L. et M.S. Brown (1973) *Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2084-2088.
- BROWN, D.A. et E. London (1998) *Functions of lipid rafts in biological membranes*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 111-136.
- BROWN, D.A. et J.K. Rose (1992) *Sorting of GPI-anchored protein to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to apical cell surface*, *Cell* 68: 533-544.
- BROWN, F.D., A.L. Rozelle, H.L. Yin, T. Balla et J.G. Donaldson (2001) *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic*, *J. Cell Biol.* 154: 1007-1017.
- BROWN, W.R., Y. Isobe et P.K. Nakane (1976) *Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. II. Immunoelectron-microscopic localization of immunoglobulins and secretory component in human intestinal mucosa*, *Gastroenterology* 71: 985-995.
- BROWN, W.V. et M.L. Baginsky (1972) *Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46: 375-382.
- BRUNDERT, M., A. Ewert, J. Heeren, B. Behrendt, R. Ramakrishnan, H. Greten, M. Merkel et F. Rinninger (2005) *Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 143-148.
- BURNETTE, W.N. (1981) « *Western blotting* »: *electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*, *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- CAI, S.F., R.J. Kirby, P.N. Howles et D.Y. Hui (2001) *Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine*, *J. Lipid Res.* 42: 902-909.
- CALVO, D. et M.A. Vega (1993) *Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family*, *J. Biol. Chem.* 268: 18929-18935.
- CAO, G., C.K. Garcia, K.L. Wyne, R.A. Schultz, K.L. Parker et H.H. Hobbs (1997) *Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1*, *J. Biol. Chem.* 272: 33068-33076.

- CASTELLI, W.P., J.T. Doyle, T. Gordon, C.G. Hames, M.C. Hjortland, S.B. Hulley, A. Kagan et W.J. Zukel (1977) *HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study*, *Circulation* 55: 767-772.
- CHARPENTIER D., C. Tremblay, E. Rassart, D. Rhainds, A. Auger, R.W. Milne et L. Brissette (2000) *Low- and high-density lipoprotein metabolism in HepG2 cells expressing various levels of apolipoprotein E*, *Biochemistry* 39: 16084-16091.
- CHARRIN, S., S. Manié, M. Oualid, M. Billard, C. Boucheix et E. Rubinstein (2002) *Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation*. *FEBS Lett.* 516: 139-144.
- CHAVRIER, P., R.G. Parton, H.P. Hauri, K. Simons et M. Zerial (1990 a) *Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments*, *Cell* 62: 317-329.
- CHAVRIER, P., C. Vingron, C. Sander, K. Simons et M. Zerial (1990 b) *Molecular cloning of YPT/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line*, *Mol. Cell Biol.* 10: 6578-6585.
- CHEN, J., M. Chloupková, J. Gao, T.L. Chapman-Arvedson et C.A. Enns (2007) *HFE modulates transferrin receptor 2 levels in hepatoma cells via interactions that differ from transferrin receptor 1/HFE interactions*, *J. Biol. Chem.* 282: 36862-36870.
- CHENG, Z.J., R.D. Singh, D.K. Sharma, E.L. Holicky, K. Hanada, D.L. Marks et R.E. Pagano (2006) *Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements*, *Mol. Biol. Cell* 14: 3197-3210.
- DAMKE, H., T. Baba, D.E. Warnock et S.L. Schmid (1994) *Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation*, *J. Cell Biol.* 127: 915-934.
- DARCHEN, F., A. Zahraoui, F. Hammel, M.P. Monteils, A. Davitian et D. Scherman (1990) *Association of the GTP-binding protein Rab3A with bovine adrenal chromaffin granules*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5692-5696.
- DAUTRY-VARSAT, A., A. Ciechanover et H.F. Lodish (1983) *pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2258-2262.
- DEAN, M., Y. Hamon et G. Chimini (2001) *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*, *J. Lipid Res.* 42: 1007-1017.
- DEHOUCK, B., L. Fenart, P. Dehouck, A. Pierce, G. Torpier et R. Cecchelli (1997) *A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier*, *J. Cell Biol.* 138: 877-889.

- DIETZEN, D.J., W.R. Hastings et D.M. Lublin (1995) *Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae*, J. Biol. Chem. 270: 6838-6842.
- DOHERTY, G.J. et H. McMahon (2009) *Mechanisms of endocytosis*, Annu. Rev. Biochem. 78: 857-902.
- DOWHAN, W. (1997) *Molecular basis for membrane phospholipids diversity: why are there so many phospholipids*, Annu. Rev. Biochem. 66: 199-232.
- DRAB, M. P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F.C. Luft, A. Schedl, H. Haller et T.V. Kurzchalia (2001) *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice*, Science 293: 2449-2452.
- D'SOUZA-SCHOREY, C. et P. Chavrier (2006) *ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7: 347-358.
- DURRBACH, A., D. Louvard et E. Coudrier (1996) *Actin filaments facilitate two steps of endocytosis*, J. Cell Sci. 109: 457-465.
- ECKHARDT, E.R., L. Cai, B. Sun, N.R. Webb et D.R. van der Westhuyzen (2004) *High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII*, J. Biol. Chem. 279: 14372-14381.
- ECKHARDT, E.R., L. Cai, S. Shetty, Z. Zhao, A. Szanto, N.R. Webb et D.R. Van der Westhuyzen (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.
- ESPENEL C., E. Margeat, P. Dosset, C. Arduise, C. Le Grimellec, C.A. Royer, C. Boucheix, E. Rubinstein et P.E. Milhiet (2008) *Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web*, J. Cell Biol. 182: 765-776.
- ESSER, V., L.E. Limbird, M.S. Brown, J.L. Goldstein et D.W. Russel (1988) *Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor*, J. Biol. Chem. 263: 13282-13290.
- FENSKE, S.A., A. Yesilaltay, R. Pal, K. Daniels, C. Barker, V. Quiñones, A. Rigotti, M. Krieger et O. Kocher (2009) *Normal hepatic cell surface localization of the high density lipoprotein receptor, scavenger receptor class B, type I, depends on all four PDZ domains of PDZK1*, J. Biol. Chem. 284: 5797-5806.
- FERNØ, J., S. Skrede, A.O. Vik-Mo, B. Håvik et V.M. Steen (2006) *Drug-induced activation of SREBP-controlled lipogenic gene expression in CNS-related cell lines: marked differences between various antipsychotic drugs*, BMC Neurosci. 7: 69-79.

- FIELDING, C.J. et P.E. Fielding (1995) *Molecular physiology of reverse cholesterol transport*, J. Lipid Res. 36: 211-228.
- FIELDING, P.E et C.J Fielding (2002) *Dynamics of lipoprotein transport en the human circulatory system* dans VANCE, D.E. et J.E. Vance (Éd.) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (4th edition) Elsevier Science, 610 pp.
- FIELDING, C.J., V.G. Shore et P.E. Fielding (1972) *A protein cofactor of lecithin: cholesterol acyltransferase*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 1493–1498.
- FIVAZ, M., F. Vilbois, S. Thurnheer, C. Pasquali, L. Abrami, P.E. Bickel, R.G Parton et F.G. van der Goot (2002) *Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins*, EMBO J. 21: 3989-4000.
- FLUITER, K. et T.J.C. Van Berkel (1997) *Scavenger receptor BI (SR-BI) substrates inhibit the selective uptake of high-density-lipoprotein cholesteryl esters by rat parenchymal liver cells*, Biochem. J. 326: 515-519.
- FÖLSH, H., J.S. Bonifacino et I. Mellman (1999) *A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells*, Cell 99: 189–198.
- FRICK, M., N.A. Bright, K. Riento, A. Bray, C. Merrified et B.J. Nichols (2007) *Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding*. Curr. Biol. 17: 1151–1156.
- FRIED, S.K., C.D. Russell, N.L. Grauso et R.E. Brolin (1993) *Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men*, J. Clin. Invest. 92: 2191-2198.
- FUJIMOTO, T., H. Kogo, R. Nomura et T. Une (2001) *Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure*, J. Cell Sci. 113: 3509–3517.
- GALBIATI, F. J.A. Engelman, D. Volonte, X.L. Zhang, C. Minetti, M. Li, H.Jr. Hou, B. Kneitz, W. Edelmann et M.P. Lisanti (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.
- GARCIA, A., R. Barbaras, X. Collet, A. Bogyo, H. Chap et B. Perret (1996) *High-density lipoprotein 3 receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2)*, Biochemistry 35: 13064-13071.
- GATFIELD, J. et J. Pieters (2000) *Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages*, Science 288: 1647–1650.

- GAUTHIER, N.C., V. Ricci, P. Gounon, A. Doye, M. Tauc, P. Poujeol et P. Boquet (2004) *Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and actin cytoskeleton modulate chloride transport by channels formed by the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin VacA in HeLa cells*, J. Biol. Chem. 279: 9481-9489.
- GLASS, C., R.C. Pittman, D.B. Weinstein et D. Steinberg (1983) *Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5435-5439.
- GLEBOV, O.O., N.A. Bright et B.J. Nichols (2006) *Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells*. Nat. Cell Biol. 8: 46-54.
- GLOMSET, J.A. (1968) *The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction*, J. Lipid Res. 9: 155-167.
- GODDETTE, D.W. et C. Frieden (1986) *Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D*, J. Biol. Chem. 261: 15974-15980.
- GOLDSTEIN, J.L., M.S. Brown, R.G. Anderson, D.W. Russel et W.J Schneider (1985) *Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system*, Annu. Rev. Cell Biol. 1: 1-39.
- GOLDSTEIN, J.L et M.S. Brown (1990) *Regulation of the mevalonate pathway*, Nature 343: 425-430.
- GORDON, D.J. et D.M. Rifkind (1989) *High-density lipoprotein – the clinical implications of recent studies*, New Eng. J. Med. 321: 1311-1316.
- GORDON, T., M. Fisher, N. Ernst et B.M. Rifkind (1981) *Relation of diet to LDL cholesterol, VLDL cholesterol, and plasma total cholesterol and triglycerides in white adults. The Lipid Research Clinics Prevalence Study*, Artherosclerosis 2: 502-512.
- GORVEL, J., P. Chavrier, M. Zerial et J. Gruenberg (1991) *Rab5 controls early endosome fusion in vitro*, Cell 64: 915-925.
- GRANT, K.I., L.A. Casciola, G.A. Coetzee, D.A. Sanan, W. Gevers et D.R. van der Westhuyzen (1990) *Ammonium chloride causes reversible inhibition of low density lipoprotein receptor recycling and accelerates receptor degradation*, J. Biol. Chem. 265: 4041-4047.
- GRASSART, A., A. Dujeancourt, P.B. Lazarow, A. Dautry-Varsat et N. Sauvonnnet (2008) *Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2*, EMBO Rep. 9: 356-362.

- GUHA, A., V. Sriram, K.S. Krishnan et S. Mayor (2003) *Shibire mutations reveal distinct dynamin-independent and -dependent endocytic pathways in primary culture of Drosophila hemocytes*, J. Cell Sci. 116: 3373-3386.
- HAN, J., A.C. Nicholson, X. Zhou, J. Feng, A.M.Jr. Gotto et D.P. Hajjar (2001) *Oxidized low density lipoprotein decreases macrophage expression of scavenger receptor B-I*, J. Biol. Chem. 276: 16567-16572.
- HANSEN, S.H., K. Sandvig et B. van Deurs (1991) *The preendosomal compartment comprises distinct coated and noncoated endocytic vesicle populations*, J. Cell Biol. 113: 731-741.
- HARA, A. et N.S. Radin (1978) *Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent*, Anal. Biochem. 90: 420-426.
- HARDER C.J., A. Meng, P. Rippstein, H.M. McBride et R. McPherson (2006 a) *SR-BI undergoes cholesterol-stimulated transcytosis to the bile canaliculus in polarized WIF-B cells*, J. Biol. Chem. 282: 1445-1455.
- HARDER, T., P. Scheiffele, P. Verkade et K. Simons (1998) *Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components*, J. Cell Biol. 141: 929-942.
- HATCH, F.T. et R.S. Lees (1968) *Practical methods for lipoprotein analysis*, Adv. Lipid Res. 6: 1-68.
- HAYDEN, J.R. et H.E. Henderson (1999) *The molecular biology and genetics of human lipoprotein lipase*, dans Betteridge D.J, D.R. Illingworth, J. Shepherd (Éd.) *Lipoproteins in health and diseases*, Londre: Oxford University Press, 247-260.
- HEMLER, M.E. (2005) *Tetraspanin functions and associated microdomains*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6: 801-811.
- HENLEY, J.R., E.W. Krueger, B.J. Oswald et M.A. McNiven (1998) *Dynamin-mediated internalization of caveolae*, J. Cell Biol. 141: 85-99.
- HENRIKSEN, T., E.M. Mahoney et D. Steinberg (1981) *Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: Recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6499-6503.
- HERSOVITS, J.S., H.S. Shpetner, C.C. Burgess et R.B. Valee (1993) *Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11468-11472.

- HEUSER, J.E. et R.G. Anderson (1989) *Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation*, J. Cell Biol. 108: 389-400.
- HILLYARD, Z., A.G. Jardine, K.J. McDonald et A.J. Cameron (2004) *Fluvastatin inhibits raft dependent Fcγ receptor signalling in human monocytes*, Atherosclerosis 172: 219–228.
- HINSHAW, J.E. et S.L. Schmid (2002) *Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding*, Nature 374: 190-192.
- HOBBS, H.H., D.W. Russell, M.S. Brown et J.L. Goldstein (1990) *The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein*, Annu. Rev. Genet. 24:133-170.
- HOEKSTRA, D., M.M. Zegers, S.C. van Ijzendoorn (1999) *Membrane flow, lipid sorting and cell polarity in HepG2 cells: role of a subapical compartment*, Biochem. Soc. Trans. 27: 422-428.
- HOLMBERG, C.G. et C.B. Laurell (1947) *Investigation of copper. I. Nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum*, Acta Chem. Scand. 1: 944-950.
- HOOPER, N.M. (1999) *Detergent insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae*, Mol. Membr. Biol. 16: 145-156.
- HORTON, J.D., N.A. Shah, J.A. Warrington, N.S. Anderson, S.W. Park, M.S. Brown et J.L. Goldstein (2003) *Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 12027-12032.
- HUA, X., C. Yokoyama, J. Wu, M.R. Briggs, M.S. Brown et J.L. Goldstein (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.
- HUA, X., J. Wu, J.L. Goldstein, M.S. Brown et H.H. Hobbs (1995) *Structure of human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13*, Genomics 25: 667-673.
- HUA, X., A. Nohturfft, J.L. Goldstein et M.S. Brown (1996) *Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein*, Cell 87: 415-426.
- HUANG, X.F. et G.S. Shelness (1997) *Identification of cysteine pairs within the amino-terminal 5% of apolipoprotein B essential for hepatic lipoprotein assembly and secretion*, J. Biol. Chem. 12: 31872-31876.

- HUARD, K., P. Bourgeois, D. Rhains, L. Faltrault, J.S. Cohn et L. Brissette (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.
- HUET, C., J.F. Ash et S.J. Singer (1980) *The antibody-induced clustering and endocytosis of HLA antigens on cultured human fibroblasts*, *Cell* 21: 429-438.
- IHRKE, G., G.V. Martin, M.R. Shanks, M. Schrader, T.A. Schroer et A.L. Hubbard (1998) *Apical plasma membrane proteins and endolyn-78 travel through a subapical compartment in polarized WIF-B hepatocytes*, *J. Cell Biol.* 141: 115-133.
- ISTVAN, E.S. et J. Deisenhofer (2000) *The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase*, *Biochim. Biophys. Acta* 1529: 9-18.
- IZEM, L., E. Rassart, L. Kamate, L. Faltrault, D. Rhains et L. Brissette (1998) *Effect of reduced low-density lipoprotein receptor level on HepG2 cell cholesterol metabolism*, *Biochem. J.* 329: 81-89.
- JAROUSE, N. et R.B. Kelly (2000) *Selective inhibition of adaptor complex-mediated vesiculation*, *Traffic* 1: 378-384.
- JI, Y., B. Yang, N. Wang, Y. Sun, M.L. Moya, M.C. Phillips, G.H. Rothblat, J.B. Swaney et A.R. Tall (1997) *Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux*, *J. Biol. Chem.* 272: 20982-20985.
- JONAS, A. (1991) *Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoprotein*, *Biochim. Biophys. Acta* 1084: 205-220.
- JUST, I., J. Selzer, M. Wilm, C. von Eichel-Streiber, M. Mann et K. Aktories (1995) *Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B*, *Nature* 375: 500-503.
- KAMPS, J.A., J.K. Kruijt, J. Kuiper et T.J. Van Berkel (1992) *Characterization of the interaction of acetylated LDL and oxidatively modified LDL with human liver parenchymal and Kupfer cells in culture*, *Arterioscler. Thromb.* 12: 1079-1087.
- KAPADIA, S.B., H. Barth, T. Baumert, J.A. McKeating et F.V. Chisari (2007) *Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I*, *J. Virol.* 81: 374-383.
- KASPROWICZ, J., S. Kuenen, K. Miskiewicz, R.L. Habets, L. Smitz et P. Verstreken (2008) *Inactivation of clathrin heavy chain inhibits synaptic recycling but allows bulk membrane uptake*, *J. Cell Biol.* 182: 1007-1016.
- KAWABATA, H., S. Yang, T. Hirama, P.T. Vuong, S. Kawano, A.F. Gombart et H.P. Koefler (1999) *Molecular cloning of transferrin receptor 2 - A new member of the transferrin receptor-like family*, *J. Biol. Chem.* 274: 20826-20832.

- KIBBEY, R.G., J. Rizo, L.M. Gierasch et R.G. Anderson (1998) *The LDL receptor clustering motif interacts with the clathrin terminal domain in a reverse turn conformation*, J. Cell Biol. 142: 59-67.
- KIM, J.B., G.D. Spotts, Y.D. Halvorsen, H.M. Shih, T. Ellenberger, H.C. Towle et B.M. Spiegelman (1995) *Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain*, Mol. Cell Biol. 15: 2582-2588.
- KING, S.Y., A.M. Basista et G. Torosian (1989) *Self-association and solubility behaviors of a novel anticancer agent, brequinar sodium*, J. Pharm. Sci. 78: 95-100.
- KIRKHAM, M., A. Fujita, R. Chadda, S.J. Nixon, T.V. Kurzchalia, D.K. Sharma, R.E. Pagano, J.F. Hancock, S. Mayor et R.G. Parton (2005) *Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vesicles*, J. Cell Biol. 168: 465-476.
- KOIVISTO, U.M., J.S. Viikari et K. Kontula (1995) *Molecular characterization of minor gene rearrangements in Finnish patients with heterozygous familial hypercholesterolemia identification of two common missense mutations (Gly823→Asp and Leu380→His) and eight rare mutations of the LDL receptor gene*, Am. J. Hum. Genet. 57: 789-797.
- KOIVISTO, U.M., A.L. Hubbard et I. Mellman (2001) *A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of LDL receptor*, Cell 105: 575-585.
- KONO, H., T. Suzuki, K. Yamamoto, M. Okada, T. Yamamoto et Z. Honda (2002) *Spatial raft coalescence represents an initial step in FcγR signaling*, J. Immunol. 169: 193-203.
- KOSAKA, T. et K. Ikeda (1983) *Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of Drosophila melanogaster, shibirets1*, J. Cell Biol. 97: 499-507.
- KOZARSKY, K.F., M.H. Donahee, A. Rigotti, S.N. Iqbal, E.R. Edelman et M. Krieger (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.
- LAEMMLI, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature 227: 680-685.
- LAMAZE, C., T.H. Chuang, L.J. Terlecky, G.M. Bokoch et S.L. Schmid (1996) *Regulation of receptor-mediated endocytosis by rho and rac*, Nature 382: 177-179.

- LAMAZE, C., L.M. Fujimoto, H.L. Yin et S.L. Schmid (1997) *The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells*, J. Biol. Chem. 272: 20332-20335.
- LAMAZE, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah et A. Dautry-Varsat (2001) *Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway*, Mol. Cell 7: 661-671.
- LAMBERT, G. (2007) *Unravelling the functional significance of PCSK9*, Curr. Opin. Lipidol. 18: 304-309.
- LANDSCHULZ, K.T., R.K. Pathak, A. Rigotti, M. Krieger et H. Hobbs (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., W. Strober et R.I. Levy (1972) *The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia*, J. Clin. Invest. 51: 1528-1536.
- LARKIN, J.M., M.S. Brown, J.L. Goldstein et R.G. Anderson (1983) *Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts*, Cell 33: 273-285.
- LAUREL, C.B. et B. Ingelman (1947) *The iron-binding protein of swine serum*, Acta Chem. Scand. 1: 770-776.
- LEHRMAN, M.A., J.L. Goldstein, M.S. Brown, D.W. Russel et W.J. Schneider (1985) *Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain*, Cell 41: 735-743.
- LEHRMAN, M.A., W.J. Schneider, M.S. Brown, C.G. Davis, A. Elhammer, D.W. Russel et J.L. Goldstein (1987) *The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained in the endoplasmic reticulum*, J. Biol. Chem. 262: 401-410.
- LEUNG, S.M., R. Rojas, C. Maples, C. Flynn, W.G. Ruiz, T.S. Jou et G. Apodaca (1999) *Modulation of endocytic traffic in polarized Madine-Darby canine kidney cells by the small GTPase RhoA*, Mol. Biol. Cell 10: 4369-4384.
- LISANTI, M.P., I.W. Caras, M.A. Davitz et E. Rodriguez-Boulan (1989) *A glycosphospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells*, J. Cell Biol. 109: 2145-2156.
- LISCUM, L. (2002) *Cholesterol biosynthesis* dans VANCE, D.E. et J.E. Vance (Éd.) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (4<sup>th</sup> edition) Elsevier Science, 610 pp.

- LIU, L., B. He, W.M. Liu, D. Zhou, J.V. Cox et X.A. Zhang (2007) *Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking*, J. Biol. Chem. 282: 31631-31642.
- LIU, T., M. Krieger, Y.H. Kan et V.I. Zannis (2002) *The effects of mutations in helices 4 and 6 of apoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport*, J. Biol. Chem. 277: 21576-21584.
- LOIKE, J.D., D.Y. Shabtai, R. Neuhut, S. Malitzky, E. Lu, J. Husemann, I.J. Goldberg et S.C. Silverstein (2004) *Statin inhibition of Fc receptor-mediated phagocytosis by macrophages is modulated by cell activation and cholesterol*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24: 2051–2056.
- LOWRY, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr et R.J. Randall (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- MACIA, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner et T. Kirchhausen (2006) *Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin*, Dev. Cell 10: 839-850.
- MALAVAL, C., M. Laffargue, R. Barbaras, C. Rolland, C. Peres, E. Champagne, B. Perret, F. Tercé, X. Collet et L.O. Martinez (2009) *RhoA/ROCK 1 signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes*, Cell Signal. 21: 120-127.
- MARSH, J.B. et F. Whereat (1959) *The synthesis of plasma lipoprotein by rat liver*, J. Lipid Res. 234: 3196-3200.
- MARTINEZ O. et B. Goud (1998) *Rab proteins*, Biochim. Biophys. Acta 14: 101-112.
- MASTICK, C.C., M.J. Brady et A.R. Saltiel (1995) *Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin*, J. Cell Biol. 129: 1523-1531.
- MATTER, K., W. Hunziker et I. Mellman (1992) *Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants*, Cell 71: 741–753.
- MAXWELL, K.N., E.A. Fisher et J.L. Breslow (2005) *Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a postendoplasmic reticulum compartment*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 2069–2074.
- MAYER, B.J., R. Ren, K.L. Clark et D. Baltimore (1993) *A putative modular domain present in diverse signalling proteins*, Cell 73: 629-630.
- MAYOR, S. et R.E. Pagano (2007) *Pathways of clathrin-independent endocytosis*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8: 603-612.

- McCLELLAND, A., L.C. Khün et F.H. Ruddle (1984) *The human transferrin receptor gene: Genomic organisation, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence*, Cell 39: 267-274.
- McFARLANE, A.S. (1958) *Efficient trace-labelling of proteins with iodine*, Nature 182: 53.
- MIAO, W.M., E. Vasile, W.S Lane et J. Lawler (2001) *CD36 associates with CD9 and integrins on human blood platelets*, Blood 97: 1689-1696.
- MINEO, C., H. Deguchi, J.H. Griffin et P.W. Shaul (2006) *Endothelial and antithrombotic actions of HDL*, Circ. Res. 98: 1352-1364.
- MINSHALL, R.D., C. Tiruppathi, S.M. Vogel et A.B. Malik (2002) *Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function*, Histochem. Cell Biol. 117: 105-112.
- MIQUEL, J.F., M. Moreno, L. Amigo, H. Molina, P. Mardones, I.I. Wistuba et A. Rigotti (2003) *Expression and regulation of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in gall bladder epithelium*, Gut 52: 1017-1024.
- MOTLEY, A., N.A. Bright, M.N.J. Seaman et M.S. Robinson (2003) *Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells*, J. Cell Biol. 162: 909-918.
- MUECKLER, M. (1994) *Facilitative glucose transporters*, Eur. J. Biochem. 219: 713-725.
- MURAO K., V. Terpstra, S.R. Green, N. Kondratenko, D. Steinberg et O. Quehenberger (1997) *Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes*, J. Biol. Chem. 272: 17551-17557.
- MURATA, M., J. Peränen, R. Schreiner, F. Wieland, T.V. Kurzchalia et K. Simons (1995) *VIP21/Caveolin is a cholesterol-binding protein*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10339-10343.
- MYAZAKI, A., H. Nakayama et S. Horiuchi (2002) *Scavenger receptors that recognize advanced glycation end product*, Trends Cardiovasc. Med. 12: 258-262.
- NAKAGAWA, A., K. Nagaosa, T. Hirose, K. Tsuda, K. Hasegawa, A. Shiratsuchi et Y. Nakanishi (2004) *Expression and function of class B scavenger receptor type I on both apical and basolateral sides of the plasma membrane of polarized testicular Sertoli cells of the rat*, Dev. Growth Differ. 46: 283-298.
- NESS, G.C. et C.M. Chambers (2000) *Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: the concept of cholesterol buffering capacity*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 224: 8-19.

-NIEDERANG, F. et P. Chavrier (2004) *Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagosome*, Curr. Opin. Cell Biol. 16: 422–428.

-NIELAND, T.J., M. Ehrlich, M. Krieger et T. Kirchhausen (2005) *Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI*, Biochim. Biophys. Acta 1734: 44-51.

-NYASAE, L.K., A.L. Hubbard et P.L Tuma (2003) *Transcytotic efflux from early endosomes is dependent on cholesterol and glycosphingolipids in polarized hepatic cells*, Mol. Biol. Cell 14: 2689-2705.

-NYDEGGER, S., S. Khurana, D.N. Krementsov, M. Foti et M. Thali (2006) *Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1*. J. Cell Biol. 173: 795-807.

-ODINTSOVA, E., J. Voortman, E. Gilbert et F. Berditchevski (2003) *Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR*, J. Cell Sci. 116: 4557-4566.

-OH, P., D.P. McIntosh et J.E. Schnitzer (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.

-OHGAMI N., R. Nagai, A. Miyazaki, M. Ikemoto, H. Arai, S. Horiuchi et H. Nakayama (2001) *Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products*, J. Biol. Chem. 276: 13348-13355.

-OHNO, H., T. Tomemori, F. Nakatsu, Y. Okazaki, R.C. Aguilar, H. Fölsch, I. Mellman, T. Saito, T. Shirasawa et J.S. Bonifacino (1999)  *$\mu$ 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells*, FEBS Lett. 449: 215–220.

-ORLANDI, P.A. et P.H. Fishman (1998) *Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains*, J. Cell Biol. 141: 905-915.

-ORTEGREN, U., M. Karlsson, N. Blazic, M. Blomqvist, F.H. Nystrom, J. Gustavsson, P. Fredman et P. Strålfors (2004) *Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat hepatocytes*, Eur. J. Biochem. 271: 2028-2036.

-OTSUKA, A., T. Abe, M. Watanabe, H. Yagisawa, K. Takei et H. Yamada (2009) *Dynamin 2 is required for actin assembly in phagocytosis in Sertoli cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 378: 478-482.

-OUT, R., M. Hoekstra, J.A. Spijkers, J.K. Kruijt, M. van Eck, I.S. Bos, J. Twisk et T.J. Van Berkel (2004) *Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake*

of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice, *J. Lipid Res.* 45: 2088-2095.

-PAGLER, T.A., S. Rhode, A. Neuhofer, H. Laggner, W. Strobl, C. Hinterdorfer, I. Volf, M. Pavelka, E.R. Eckhardt, D.R. van der Westhuyzen, G.J. Schütz et H. Stangl (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. Phys.* 24: 1424.

-PAPINI, E., B. Satin, C. Bucci, M. de Bernard, J.L. Telford, R. Manetti, R. Rappuoli, M. Zerial et C. Montecucco (1997) *The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by Helicobacter pylori cytotoxin*, *EMBO J.* 16: 15-24.

-PEARSE, M.B. (1976) *Clathrin: A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1255-1259.

-PELKMANS, L., J. Kartenbeck et A. Helenius (2001) *Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER*, *Nat. Cell Biol.* 3: 473-483.

-PELKMANS, L., D. Puntener et A. Helenius (2002) *Local actin polymerization and dynamin recruitment in caveolar SV40-induced internalization of caveolae*, *Science* 296: 535-539.

-PELKMANS, L., T. Burli, M. Zerial et A. Helenius (2004) *Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic*, *Cell* 118: 767-780.

-PETERS, K.R., W.W. Carley et G.E. Palade (1985) *Endothelial plasmalemmal vesicles have a characteristic striped bipolar surface structure*, *J. Cell Biol.* 101: 2233-2238.

-PIETERS, M.N., G.R. Castro, D. Schouten, P. Duchateau, J.C. Fruchart et T.J.C van Berkel (1993) *Cholesterol esters selectively delivered in vivo by high-density-lipoprotein subclass LpA-I to rat liver are processed faster into bile acids than are LpA-I/A-II-derived cholesterol esters*, *Biochem. J.* 292: 819-823.

-PILERI, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi et S. Abrignani (1998) *Binding of hepatitis C virus to CD81*, *Science* 282, 938-941.

-POIRIER, S., G. Mayer, V. Poupon, P.S. McPherson, R. Desjardins, K. Ly, M.C. Asselin, R. Day, F.J. Duclos, M. Witmer, R. Parker, A. Prat et N.G. Seidah (2009) *Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced LDLR degradation: Evidence for an intracellular route*, *J. Biol. Chem.* 284: 28856-28864.

- PURI, V., R. Watanabe, R.D. Singh, M. Dominguez, J.C. Brown, C.L. Weathley, D.L. Marks et R.E. Pagano (2001) *Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways*, J. Cell Biol. 154: 535-547.
- RAWSON, R.B., N.G. Zelenski, D. Nijhawan, J. Ye, J. Sakai, M.T. Hasan, T.Y. Chang, M.S. Brown et J.L. Goldstein (1997) *Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs*, Mol. Cell 1: 47-57.
- RAZANI, B., X.B. Wang, J.A. Engelman, M. Battista, G. Lagaud, X.L. Zhang, B. Kneitz, H.Jr. Hou, G.J. Christ, W. Edelmann et M.P. Lisanti (2002) *Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae*, Mol. Cell. Biol. 22: 2329-2344.
- RESH, M.D. (1999) *Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of meristoylated and palmitoylated proteins*, Biochim. Biophys. Acta 1451: 1-16.
- RHAINDS, D., L. Falstraalt, C. Tremblay et L. Brissette (1999) *Uptake and fate of class B scavenger receptor ligands in HepG2 cells*, Eur. J. Biochem. 261: 227-235.
- RHAINDS, D., M. Brodeur, J. Lapointe, D. Charpentier, L. Falstraalt et L. Brissette (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., P. Bourgeois, G. Bourret, K. Huard, L. Falstraalt et L. Brissette (2004) *Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells*, J. Cell Sci. 117: 3095-3105.
- RIDLEY, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann et A. Hall (1992) *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling*, Cell 70: 401-410.
- RINK, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis et M. Zerial (2005), *Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes*, Cell 122: 735-749.
- ROBERTS, D.C., N.E. Miller, S.G. Price, D. Crook, C. Cortese, A. La Ville, L. Masana et B. Lewis (1985) *An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro*, Biochem. J. 226: 319-322.
- RODRIGUEZA, W.V., S.T. Thuahnai, R.E. Temel, S. Lund-Katz, M.C. Phillips et D.L. Williams (1999) *Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells*, J. Biol. Chem. 274: 20344-20350.
- ROTHBERG, K.G., J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney et R.G. Anderson (1992) *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*, Cell 68: 673-682.

- ROSSMAN, K.L., C.J. Der et J. Sondek (2005) *GEF means go: turning on rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6: 167-180.
- ROY, C.N., D.M. Penny, J.N. Feder et C.A. Enns (1999) *The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells*, J. Biol. Chem. 274: 9022-9028.
- SABHARANJAK, S., P. Sharma, R.G. Parton et S. Mayor (2002) *GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc-42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway*, Dev. Cell 2: 411-423.
- SAKAI, J., R.B. Rawson, P.J. Espenshade, D. Cheng, A.C. Seegmiller, J.L. Goldstein et M.S. Brown (1998) *Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells*, Mol. Cell 2: 505-514.
- SANDVIG, K., Olsnes, S., Peterson, O.W. et van Deurs B. (1987) *Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits*, J. Cell Biol. 105: 679-689.
- SANDVIG, K. et B. van Deurs (1994) *Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin*, FEBS Lett. 6: 99-102.
- SARGIACOMO, M., M. Sudol, Z. Tang et M.P. Lisanti (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, R. et T. Takano (1995) *Regulation of intracellular cholesterol metabolism*, Cell Struct. Funct. 20: 420-427.
- SAUVONNET, N., A. Dujeancourt et A. Dautry-Varsat (2005) *Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of  $\gamma$  cytokine receptor*, J. Cell Biol. 168: 155-163.
- SCARSELLI, E., H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese et A. Vitelli (2002) *The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus*, EMBO J. 21: 5017-5025.
- SCHNEIDER, W.J. (2002) *Lipoprotein receptors* dans VANCE, D.E. et J.E. Vance (Éd.) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (4<sup>th</sup> edition) Elsevier Science, 610 pp.
- SEIDAH, N.G., S. Benjannet, L. Wickham, J. Marcinkiewicz, S.B. Jasmin, S. Stifani et A. Basak (2003) *The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 12027-12032.

- SEGREST, J.P., M.K. Jones, H. De Loof, C.G. Brouillette, Y.V Venkatachalapathi et G.M. Anantharamaiah (1992) *The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function*, J. Lipid Res. 33: 141-166.
- SEHAYEK E., R. Wang, J.G. Ono, V.S. Zinchuk, E.M. Duncan, S. Shefer, D.E. Vance, M. Ananthanarayanan, B.T. Chait et J.L. Breslow (2003) *Localization of the PE methylation pathway and SR-BI to the canalicular membrane: evidence for apical PC biosynthesis that may promote biliary excretion of phospholipid and cholesterol*, J. Lipid Res. 44: 1605-1613.
- SHAJAHAN, A.N., B.K. Timblin, R. Sandoval, C. Tirupathi, A.B. Malik et R.D. Minshall (2004) *Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells*, J. Biol. Chem. 279: 20392-20400.
- SHARMA, D.K., J.C. Brown, A. Choudhury, T.E. Peterson, E. Holicky, D.L. Marks, R. Simari, R.G Parton et R.E. Pagano (2004) *Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol*, Mol. Biol. Cell 15: 3114-3122.
- SHEETS, E.D., D. Holowa et B. Baird (1999) *Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcεRI and their association with detergent-resistant membranes*, J. Cell Biol. 145: 877-887.
- SHEETZ, M.P. et S.J. Singer (1974) *Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 4457-4461.
- SHEN, M.M.S., R.M. Krauss, F.T. Lindgren et T.M Forte (1981) *Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects*, J. Lipid Res. 22: 236-244.
- SHIN, J.S., Z. Gao et N. Abraham (2000) *Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells*, Science 289: 785-788.
- SILVER, D.L. (2004) *SR-BI and protein-protein interactions in hepatic high density lipoprotein metabolism*, Rev. Endocr. Metab. Disord. 5: 327-333.
- SIMIONESCU, N., E. Vasile, F. Lupu, G. Popescu et M. Simionescu (1989) *Prelesional events in atherogenesis: accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit*, Am. J. Pathol. 123: 1109-1125.
- SIMONS, K. et E. Ikonen (1997) *Functional rafts in epithelial cells*, Nature 387: 569-572.
- SIMONS, K. et G. van Meer (1988) *Lipid sorting in epithelial cells*, Biochemistry 27: 6197-6202.
- SIMONS K. et D. Toomre (2000) *Lipid rafts and signal transduction*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 31-41.

-SINGER, S.J. et G.L. Nicholson (1972) *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*, Science 175: 720-731.

-SKIPSKI, V.P. (1972) *Lipid composition of lipoproteins in normal and diseased states*. Dans: G.J. Nelson (Éd.) *Blood lipids and lipoproteins: Quantitation Composition, and metabolism*. Wiley-Interscience, New York, 980 pp.

-SLIMANE, T.A., G. Trugnan, S.C. Van IJzendoorn et D. Hoekstra (2003) *Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains*, Mol. Biol. Cell. 14: 611-624.

-SMART, E.J., Y.S. Ying, C. Mineo et R.G.W. Anderson (1995) *A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10104-10108.

-SMITH, J.R., T.F. Osborne, J.L. Goldstein et M.S. Brown (1990) *Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene*, J. Biol. Chem. 265: 2306-2310.

-SNIDER, M.D. et O.C. Rogers (1985) *Intracellular movement of cell surface receptors after endocytosis: resialylation of asialo-transferrin receptor in human erythroleukemia cells*, J. Cell Biol. 100: 826-834.

-SNYDER, J.T., K.L. Rossman, M.A. Baumeister, W.M. Pruitt, D.P. Siderovski, C.J. Der, M.A. Lemmon et J. Sondek (2001) *Quantitative analysis of the effect of phosphoinositide interactions on the function of Dbl family proteins*, J. Biol. Chem. 276: 45868-45875.

-SOUTAR A.K. et R.P. Naoumova (2007) *Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia*, Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 4: 214-225.

-SPADY, D.K., D.M. Kearney et H.H. Hobbs (1999) *Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-B1) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster*, J. Lipid Res. 40: 1384-1394.

-STEIN, Y., Y. Dabach, G. Hollander, G. Halperin et O. Stein (1983) *Metabolism of HDL-cholesteryl ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleyl ether*. Biochim. Biophys. Acta 752: 98-105.

-STEINBERG, D., S. Parthasarathy, T.E. Carew, J.C. Khoo et J.L. Witztum (1989) *Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity*, New Eng. J. Med. 320: 915-924.

-SUBTIL, A., I. Gaidarov, K. Kobylarz, M.A. Lampson, J.H. Keen et T.E. McGraw (1999) *Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 6775-6780.

- SUN, B., E.R. Eckhardt, S. Shetty S, D.R. van der Westhuyzen et N.R. Webb (2006) *Quantitative analysis of SR-BI-dependent HDL retroendocytosis in hepatocytes and fibroblasts*, J. Lipid Res. 47: 1700-1713.
- SUN, B, B.B. Boyanovsky, M.A. Connelly, P. Shridas, D.R. van der Westhuyzen et N.R. Webb (2007) *Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI*, J. Lipid Res. 48: 2560-2570.
- SYMONS, M. et N. Rusk (2003) *Control of vesicular trafficking by Rho GTPases*, Curr. Biol. 13: 409-418.
- SYMONS, M. et J. Settleman (2000) *Rho family GTPases: more than simple switches*, Trends Cell Biol. 10: 415-419.
- TABAS, I. (2002) *Lipids and atherosclerosis* dans VANCE, D.E. et J.E. Vance (Éd.) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (4<sup>th</sup> edition) Elsevier Science, 610 pp.
- TANG, Z., P.E Scherer, T. Okamoto, K. Song, C. Chu, D.S. Kohtz, I. Nishimoto, H.F. Lodish et M.P. Lisanti (1996) *Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle*, J. Biol. Chem. 271: 225-2261.
- TASKINEN, M.R., J. Kahri, V. Koivisto, J. Shepherd et C.J. Packard (1992) *Metabolism of HDL apolipoprotein A-I and A-II in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus*, Diabetologia 35: 347-356.
- TESSIER, C., P. Nuss, G. Staneva et C. Wolf (2008) *Modification of membrane heterogeneity by antipsychotic drugs: an X-ray diffraction comparative study*, J. Colloid. Interface Sci. 320: 469-475.
- TRUONG T.Q., A. Auger, F. Denizau et L. Brissette (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.
- TRUONG, T.Q., D. Aubin, P. Bourgeois, L. Falstrault et L. Brissette (2006) *Opposite effect of caveolin-1 in the metabolism of high-density and low-density lipoproteins*, Biochim. Biophys. Acta 1761: 24-36.
- TSUJI, Y, L.L. Miller, S.C. Miller, S.V. Torti et F.M. Torti (1991) *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha regulate transferrin receptor in human diploid fibroblasts. Relationship to the induction of ferritin heavy chain*, J. Biol. Chem. 266: 7257-7261.
- TUMA, P.L., L.K Nyasae et A.L. Hubbard (2002) *Nonpolarized cells selectively sort apical proteins from cell surface to a novel compartment, but lack apical retention mechanisms*, Mol. Biol. Cell 13: 3400-3415.

- TUMA, P.L. et L. Hubbard (2003) *Transcytosis: Crossing cellular barriers*, *Physiol. Rev.* 83: 871-932.
- ULLRICH, O., S. Reinsch, S. Urbe, M. Zerial et R.J Parton (1996) *Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome*, *J. Biol. Cell* 135: 913-924.
- URBE, S., L.A. Huber, M. Zerial, S.A. Tooze et R.G. Parton (1993) *Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells*, *FEBS Lett.* 334: 175-182.
- Van der SLUIJS, P., M. Hull, P. Webster, P. Male, B. Goud et I. Mellman (1992) *The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway*, *Cell* 70: 729-740.
- Van MEER, G. (1989) *Lipid traffic in animal cells*, *Annu. Rev. Cell Biol.* 5: 247-275.
- VANCE, J.E. (2002) *Assembly and secretion of lipoproteins* dans VANCE, D.E. et J.E. Vance (2002) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (4th edition) Elsevier Science, 610 pp
- WANG L. et J.L. BOYER (2004) *The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes*, *Hepatology* 39: 892-899.
- WANG, L.H., K.G. Rothberg et R.G. Anderson (1993) *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation*, *J. Cell Biol.* 123: 1107-1117.
- WANG, N., T. Arai, Y. Ji, F. Rinninger et A.R. Tall (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, X., M.R. Briggs, X. Hua, C. Yokoyama, J.L. Goldstein et M.S. Brown (1993) *Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization*, *J. Biol. Chem.* 268: 14497-14504.
- WANG, X., R. Kumar, J. Navarre, J.E. Casanova et J.R. Goldenring (2000) *Regulation of vesicle trafficking in MDKC cells by Rab11a and Rab25*, *J. Biol. Chem.* 275: 29138-29146.
- WAUGH, M.G., D. Lawson et J.J. Hsuan (1999) *Epidermal growth factor receptor activation is localized within low-buoyant density, non caveolar membrane domains*, *Biochem. J.* 337: 591-597.
- WEBB, Y., L. Hermida-Matsumoto et M.D Resch (2000) *Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids*, *J. Biol. Chem.* 275: 261-270.

- WÖLLE, S., D.P. Via, L. Chan, J.A. Cornicelli et C.L. Bisgaier (1995) *Hepatic overexpression of bovine scavenger receptor type I in transgenic mice prevents diet-induced hyperbetalipoproteinemia*, J. Clin. Invest. 96: 260-272.
- WÜSTNER, D., M. Mondal, A. Huang et F.R. Maxfield (2004) *Different transport routes for high density lipoprotein and its associated free sterol in polarized hepatic cells*, J. Lipid Res. 45: 427-437.
- XU, C., Y.H. Zhang, M. Thangavel, M.M. Richardson, L. Liu, B. Zhou, Y. Zheng, R.S. Ostrom et X.A. Zhang (2009) *CD82 endocytosis and cholesterol-dependent reorganization of tetraspanin webs and lipid rafts*, FASEB J. 23: 3273-3288.
- YAMADA, E. (1955) *The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse*, J. Biophys. Biochem. Cytol. 1: 445-458.
- YANG, X., C. Claas, S.K. Kraeft, L.B. Chen, Z. Wang, J.A. Kreidberg et M.E. Hemler (2002) *Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology*. Mol. Biol. Cell 13: 767-781.
- YOKOYAMA, C., X. Wang, M.R. Briggs, A. Admon, J. Wu, X. Hua, J.L. Goldstein et M.S. Brown (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.
- ZANNIS, V.I., S.K. Karathanasis, H.T. Keutmann, G. Goldberger et J.L. Breslow (1983) *Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein A-I: secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2574-2578.
- ZHANG, Y., A.M. Ahmed, T. L. Tran, J. Lin, N. McFarlane, D. R. Boreham, S.A. Igdoura, R. Truant et B.L. Trigatti (2007) *The inhibition of endocytosis affects HDL-lipid uptake mediated by the human scavenger receptor class B type I*, Mol. Membr. Biol. 24: 442-454.