

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole Doctorale E2S-UFR Sciences de la Vie

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de la vie

Présentée par
Benjamin BOUILLET

Présentée et soutenue publiquement le 24 Octobre 2013

**Etude de la capacité d'inhibition de l'apolipoprotéine C1
sur l'activité de la protéine de transfert des esters de
cholestérol chez des patients coronariens
normolipidémiques et hyperlipidémiques et chez des
patients diabétiques**

Directeur de thèse : Professeur Bruno VERGES
Co-Directeur de thèse : Laurent LAGROST

RESUME

Une augmentation de l'activité de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) est retrouvée associée à une élévation du développement de l'athérosclérose. L'apolipoprotéine C1 est l'inhibiteur physiologique de la CETP. Ses propriétés électrostatiques jouent un rôle important dans sa capacité d'inhibition de l'activité CETP.

Aucune étude de ce potentiel inhibiteur de l'apoC1 n'a été réalisée chez des patients à haut risque cardio-vasculaire ou dyslipidémiques. Nous avons souhaité étudier la fonctionnalité de l'apoC1 par rapport à la CETP chez des patients coronariens normolipidémiques et hyperlipidémiques dans une première étude et chez des patients diabétiques de type 1 et de type 2 en comparaison à des sujets sains normolipidémiques dans une seconde étude.

Nous avons confirmé que l'apoC1 était un inhibiteur physiologique de la CETP chez l'homme normolipidémique. Nous avons montré pour la première fois la perte de cette capacité d'inhibition en cas d'hyperlipidémie chez des sujets coronariens et en cas de diabète de type 1 ou de type 2.

En cas d'hyperlipidémie, l'hypertriglycémie joue un rôle important en stimulant la réaction de transfert des esters de cholestérol. La possible modification de répartition de l'apoC1 entre HDL et VLDL secondaire à l'hyperlipidémie est probablement également impliquée dans cette perte de fonctionnalité.

Au cours du diabète, notamment de type 1, nous avons démontré que l'hyperglycémie, à l'origine du phénomène de glycation, participe, au moins en partie, à cette perte de potentiel inhibiteur. Nous avons également mis en évidence que la glycation *in vitro* de l'apoC1 modifiait sa charge électrostatique, facteur déterminant de son potentiel inhibiteur.

Mots clés : apolipoprotéine C1, CETP, hyperlipidémie, coronaropathie, glycation, diabète

ABSTRACT

High cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity was found to accelerate the progression of atherosclerosis. Apolipoprotein C1 (apoC1) is a potent physiological inhibitor of CETP. ApoC1 operates as CETP inhibitor through its ability to modify the electrostatic charge at the lipoprotein surface.

The inhibitory potential of apoC1 has never been studied in high risk patients or in patients with hyperlipidemia. Our aim was to address the functionality of apoC1 as CETP inhibitor in normo- and hyperlipidemic patients with documented coronary artery disease and in patients with type 1 and type 2 diabetes in comparison with normolipidemic-normoglycemic healthy subjects.

We confirmed that apoC1 is a physiological inhibitor of CETP in normolipidemic subjects. We showed for the first time that this inhibitory potential is lost in hyperlipidemic patients with coronary artery disease and in patients with type 1 or type 2 diabetes.

During hyperlipidemia, abundant triglyceride-rich lipoproteins, as preferential acceptors of HDL cholesteryl ester, probably drive the CETP-mediated cholesteryl ester transfer reaction. The modified distribution of apoC1 between HDL and VLDL might play a role in this loss of inhibitory property.

During diabetes, especially in type 1, we showed that hyperglycemia, responsible for glycation, is involved, at least in part, in this loss of CETP inhibitory ability of apoC1. We also showed that *in vitro* glycation of apoC1 changed its electrostatic properties, which is recognized as a major determinant of its inhibitory ability.

Key words: apolipoprotein C1, CETP, hyperlipidemia, coronary artery disease, glycation, diabetes

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION	16
ETAT DE LA QUESTION	18
I- Métabolisme des lipoprotéines	19
1- Structure et fonction des lipoprotéines	19
1-1 Classification	19
1-2 Composition des lipoprotéines	20
1-3 Trafic intravasculaire des lipoprotéines	23
2- Prise en charge des lipides exogènes par l'intestin et transport vers le foie :	
voie entérohépatique	25
2-1 Absorption intestinale des lipides d'origine alimentaire	25
2-2 Assemblage des chylomicrons	25
2-3 Métabolisme intravasculaire des chylomicrons	26
3- Transport des lipides du foie vers les tissus périphériques :	
voie endogène d'apport	29
3-1 Assemblage VLDL	29
3-2 Remodelage des VLDL	30
3-3 Clairance des VLDL, IDL et LDL	31
4- Voie de retour des tissus périphériques vers le foie :	
concept du transport « reverse » du cholestérol	36
4-1 HDL naissantes : accepteurs initiaux du cholestérol cellulaire	36
4-2 Mécanisme d'efflux du cholestérol vers les HDL	38
4-3 Formation des HDL matures	41
4-4 Remodelage des HDL	42
4-5 Clairance des HDL et élimination du cholestérol	44

5- CETP	49
5-1 Structure et fonction	49
5-2 Inhibition de la CETP	50
5-2-1 CETP et athérosclérose	50
5-2-2 Inhibiteurs pharmacologiques de la CETP	52
5-2-3 Autres inhibiteurs de la CETP	54
5-2-4 Controverses concernant l'inhibition de la CETP	55
II- Anomalies du métabolisme des lipoprotéines au cours du diabète	58
1- Influence de l'insuline sur le métabolisme des lipoprotéines	58
2- Anomalies lipidiques au cours du diabète de type 1	59
2-1 Anomalies lipidiques quantitatives	59
2-2 Anomalies lipidiques qualitatives	62
3- Anomalies lipidiques au cours du diabète de type 2	66
3-1 Anomalies lipidiques quantitatives et qualitatives	66
3-2 Mécanismes des anomalies lipidiques	67
III- L'apolipoprotéine C1	72
1- Structure de l'apoC1	72
2- Répartition et concentration plasmatique de l'apoC1	73
3- Gène de l'apoC1	73
4- Polymorphisme de l'apoC1	74
5- ApoC1 et métabolisme des lipoprotéines	77
5-1 Rôle de l'apoC1 dans le métabolisme des VLDL	77
5-2 Rôle de l'apoC1 dans le métabolisme des HDL	81
5-3 ApoC1 et activité CETP	82
5-4 Influence des dyslipidémies sur la répartition et la concentration plasmatique en apoC1	85
6- ApoC1 et tissu adipeux	87
7- ApoC1 et fonctions cognitives	90
8- ApoC1 et LPS	93
9- ApoC1 et athérosclérose	96

TRAVAUX DE THESE	100
I- Etude de la capacité d'inhibition de l'apoC1 sur l'activité CETP chez des patients coronariens avec ou sans dyslipidémie	101
1. Introduction	101
2. Article n°1	102
3. Discussion	112
II- Etude de la capacité d'inhibition de l'apoC1 sur l'activité CETP chez des patients diabétiques de type 1 et de type 2	114
1. Introduction	114
2. Communication orale	115
3. Poster commenté	115
4. Article n°2	115
5. Discussion	145
CONCLUSION	149
PERSPECTIVES	150
BIBLIOGRAPHIE	151
ANNEXES	188

REMERCIEMENTS

Au Professeur Laurence Duvillard, Présidente du Jury

Je te remercie sincèrement d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je suis honoré que tu puisses apporter ton expertise sur mes travaux de recherche qui constituent une véritable course de fond. Ils nécessitent une grande endurance, de la régularité et une bonne gestion de l'effort pour placer une accélération dans la dernière ligne droite.

Au Professeur Bruno Verges, Directeur de Thèse

Merci pour votre aide tout au long de ces quatre années de travaux de recherche. Les premiers mois ont été peu productifs du fait de mon activité clinique mais seul le résultat final compte. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je compte bien profiter de votre savoir et de votre expérience au cours des années à venir pour continuer à progresser.

Au Professeur Bruno Guerci, Rapporteur

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail de thèse. Je suis honoré que vous puissiez juger mes travaux de recherche.

Au Professeur Bertrand Cariou, Rapporteur

Merci d'avoir examiné en détail mon manuscrit pour en sortir les forces et les faiblesses. Cela m'a permis je l'espère d'en améliorer la qualité. Cela m'a également rappelé l'intérêt de rester critique sur les données de la littérature et sur son propre travail.

A Audrey,

Merci pour tes encouragements lorsque les manip ne fonctionnaient pas. Merci pour ta compréhension pour les soirées sacrifiées à la rédaction de ce manuscrit. Merci d'avoir éprouvé mes qualités pédagogiques pour te faire comprendre les subtilités de mes travaux. Mais surtout merci d'être à côté de moi chaque jour et de m'apporter tout ton amour. N'oublie pas.

A mes parents,

Merci pour votre soutien tout au long de ces longues années d'études. Finalement je fais de la médecine et de la recherche.

A Pascal,

Merci pour tes relectures attentives qui ont permis de soigner la forme de ce manuscrit. Tu as toujours été très curieux par rapport aux expérimentations que je pouvais mener. J'espère avoir été le plus clair possible dans mes explications et j'espère avoir d'autres résultats à t'exposer dans les années à venir.

A Patricia,

Merci d'avoir pris régulièrement des nouvelles de l'avancée de mes travaux.

A Ludi,

Merci pour ton œil expert de la langue française dans la relecture du manuscrit.

A François,

Merci pour tes talents culinaires, excellent moyen pour nous faire passer de bonnes soirées de détente.

A Adèle,

Source de fraîcheur et de bonheur.

A Baptiste et à Elise,

A Yann, Julie et Mamie Bataillou,

A Laurent,

Merci pour ton encadrement tout au long de ce travail. Merci pour tes conseils qui m'ont permis d'avancer dans la bonne direction et pour tes commentaires essentiels à la rédaction de notre article en cours de révision. J'espère pouvoir continuer à collaborer avec toi et ton équipe, avec d'aussi bons résultats.

A Thomas,

Merci pour ton aide indispensable, sans laquelle je n'aurais pas pu en arriver là. Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur, même lorsque mes sollicitations étaient fréquentes.

A Jean-Paul,

C'est en partie grâce à toi si j'en suis là aujourd'hui. Tu m'as accueilli et encadré lorsque j'ai fait mon master 2. Tu m'as appris beaucoup de choses que je mets en pratique à chaque manip. Tu m'as transmis l'importance d'être bien préparé avant de se lancer dans une manip mais aussi d'être rigoureux et précis. Merci pour tout.

A Denis,

Merci pour ton aide précieuse dans la réalisation des IEF.

A Jean-Michel,

Merci pour tes conseils avisés, toujours précieux, qui me permettent d'avancer dans tous mes projets de recherche. Je suis très heureux de pouvoir travailler avec toi au quotidien.

A Perrine,

Mon binôme sur le versant clinique. Notre excellente entente m'a permis de m'organiser au mieux pour mener à bien mon activité clinique et de recherche. Merci.

A Elodie,

Ta présence avec nous dans le secteur depuis l'année dernière m'a permis de dégager un temps précieux dans la réalisation des dernières manips et de ce manuscrit. Merci.

A Isabelle, Véronique et Philippe,

Pour votre rôle dans les prélèvements des patients qui ont permis de mener à bien ce travail

A mes autres collègues médecins du service d'endocrinologie-diabétologie,

Aux infirmières du service et du centre de santé,

Aux patients et aux volontaires sains qui ont accepté de participer aux études,

A mes grands-parents,

Sans qui je ne serais pas là aujourd'hui et qui ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

Je vous dédie ce travail. Je pense à vous.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure générale d'une lipoprotéine

Figure 2. Les trois voies du transport intravasculaire du cholestérol

Figure 3. Action de la lipoprotéine lipase (LPL) sur les lipoprotéines plasmatiques riches en triglycérides

Figure 4. Endocytose et dégradation des lipoprotéines de basse densité (LDL) : modèle de régulation de Brown et Goldstein

Figure 5. Mécanismes de génération des préβHDL

Figure 6. Protéines et mécanismes impliqués dans l'efflux de cholestérol vers les HDL

Figure 7. Métabolisme des HDL et transport reverse du cholestérol

Figure 8. Métabolisme hépatique du cholestérol

Figure 9. Structure de la CETP

Figure 10. Mécanisme proposé du transport d'esters de cholestérol par la CETP

Figure 11. Principales anomalies du métabolisme des lipoprotéines au cours du diabète de type 2

Figure 12. Structure de l'apoC1

Figure 13. Structure du gène de l'apoC1

Figure 14. Influence de l'apoC1 sur le métabolisme des lipoprotéines

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques physicochimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines

Tableau 2. Principales apolipoprotéines humaines : expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction

Tableau 3. Transporteurs et protéines impliquées dans la prise en charge intestinale des lipides

Tableau 4. Principales enzymes et protéines de transfert impliquées dans le remodelage des lipoprotéines dans le compartiment intravasculaire

Tableau 5. Récepteurs cellulaires des lipoprotéines

Tableau 6. Distribution de l'ARNm de l'apoC1 dans les tissus

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC-A1: ATP binding cassette A1
ABC-G1: ATP binding cassette G1
ACAT: acylcoenzyme A cholestérol acyltransferase
ApoA : apolipoprotéine A
ApoB : apolipoprotéine B
ApoC1 : apolipoprotéine C1
ApoE : apolipoprotéine E
ATP : adenosyl tri phosphate
CAP-18 : peptide 18 cationique antimicrobien
CETP: cholesteryl ester transfer protein
DT1 : diabète de type 1
DT2 : diabète de type 2
EC: ester de cholestérol
EL: lipase endothéliale
FABP_{pm}: plasma membrane fatty acid binding protein
FAT: fatty acid translocase
FATP: fatty acid transport protein
HDL: high density lipoprotein
HL: hepatic lipase
ICAM-1: inter cellular adhesion molecule 1
IDL: intermediate density lipoprotein
IL-1: interleukine 1
LALF: facteur Limulus anti-LPS
LCAT: lecithine cholesterol acyl transferase
LDL: low density lipoprotein
LDL-R: LDL receptor
LPL: lipoprotein lipase
LPS: lipopolysaccharide
LRP: LDL receptor related protein
MTP: microsomal transfer protein
NPC1L1: Niemann-pick C1 like 1

PCSK9: proprotein convertase subtilisin/hexin 9

pI : point isoélectrique

PL: phospholipides

PLTP: phospholipides transfer protein

SR-BI: scavenger receptor BI

SREBP: sterol response element binding protein

TLR-4: toll like receptor 4

TNF α : tumor necrosis factor alpha

TG: triglycérade

VLDL: very low density lipoprotein

VLDL-R: VLDL receptor

WT: wild type

INTRODUCTION

L'athérosclérose se caractérise par le dépôt d'une plaque lipidique (athérome) sur la paroi des artères entraînant par la suite sa lésion (sclérose). L'athérosclérose est à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires, qui restent la première cause mortalité dans les pays développés, notamment en France avec 180000 décès par an. De nombreux facteurs sont impliqués dans le développement de l'athérosclérose, un des plus importants étant l'hyperlipidémie. La prise en charge des anomalies du métabolisme lipidique revêt ainsi un intérêt tout particulier pour lutter contre l'athérosclérose.

La protéine de transfert des esters de cholestérol (*cholesteryl ester transfer protein* CETP), qui assure les échanges d'esters de cholestérol et de triglycérides entre les lipoprotéines de haute densité (*high density lipoprotein* HDL) et les lipoprotéines contenant de l'apolipoprotéine B (apoB), est impliquée dans le développement de l'athérosclérose. Ses propriétés pro- ou anti-athérogènes font l'objet d'un large débat depuis de nombreuses années. Des données soulignent tout de même qu'une élévation de l'activité de la CETP est associée à une augmentation du développement de l'athérosclérose et à une augmentation de l'incidence des maladies coronariennes. C'est dans ce contexte, que des inhibiteurs pharmacologiques de la CETP ont été développés au cours des dernières années, avec pour objectif de diminuer le risque cardio-vasculaire.

L'apolipoprotéine C1 (apoC1), petite apolipoprotéine synthétisée principalement par le foie et liée aux lipoprotéines de très basse densité (*very low density lipoprotein* VLDL) et aux HDL, est impliquée dans le métabolisme de ces deux familles de lipoprotéines. Il a été démontré au cours de la dernière décennie que l'apoC1 était le principal inhibiteur physiologique de la CETP. Cet effet a été confirmé chez l'homme normolipidémique. Cependant, la fonctionnalité de l'apoC1 sur l'activité CETP n'a jamais été étudiée dans des populations à haut risque cardio-vasculaire, comme les patients coronariens ou diabétiques et en situation d'hyperlipidémie.

Ainsi, en raison de l'implication d'une activité CETP augmentée dans le développement de l'athérome et du rôle inhibiteur endogène de l'apoC1 sur la CETP, il nous a semblé important d'étudier la capacité d'inhibition de l'apoC1 sur l'activité CETP chez des patients coronariens normolipidémiques et hyperlipidémiques et chez des patients diabétiques.

Nous détaillerons ainsi dans une première partie les principaux éléments du métabolisme des lipoprotéines, le fonctionnement de la CETP, les anomalies lipidiques

rencontrées au cours du diabète et les fonctionnalités connues à ce jour de l'apoC1. Puis, nous exposerons nos travaux de thèse avant de présenter les perspectives ouvertes par nos résultats.

ETAT DE LA QUESTION

I- Métabolisme des lipoprotéines

Les lipides (cholestérol non estérifié, esters de cholestérol, triglycérides et phospholipides) sont des composés hydrophobes. Leur transport à travers les milieux aqueux de l'organisme (plasma, lymphes, liquide interstitiel) est assuré par les lipoprotéines. Les apolipoprotéines, constituants protéiques des lipoprotéines, jouent un rôle stabilisateur essentiel. Elles déterminent également le devenir métabolique des lipoprotéines en permettant le transport et le ciblage des lipides des sites d'absorption/production vers les tissus d'utilisation, de stockage ou de transformation. Les lipoprotéines ont connu un intérêt grandissant à partir des années 1940, date à laquelle les études de population ont montré que le cholestérol des lipoprotéines plasmatiques était un facteur hautement prédictif du risque cardio-vasculaire.

1- Structure et fonction des lipoprotéines

1-1 Classification

Les lipoprotéines peuvent être séparées en 2 classes en fonction de leur mobilité électrophorétique comparable à celle des globulines α 1 et β .

Une classification plus fine et plus complète a permis de classer les lipoprotéines grâce aux techniques d'ultracentrifugation, en fonction de leur densité hydratée, qui est directement fonction des proportions relatives de lipides (densité inférieure à celle de l'eau) et de protéines (densité supérieure à celle de l'eau). Six populations peuvent être distinguées dans le plasma humain : les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (*very low density lipoprotein* VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (*intermediate density lipoprotein* IDL), les lipoprotéines de basse densité (*low density lipoprotein* LDL), les lipoprotéines de haute densité (*high density lipoprotein* HDL) et la lipoprotéine a (Lp(a)) (Tableau1). Cette classification s'est révélée essentielle lorsque les études cliniques ont montré que l'incidence des maladies cardio-vasculaires était corrélée positivement avec le cholestérol des LDL et négativement avec le cholestérol des HDL.

Tableau 1. Caractéristiques physicochimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines

Lipoprotéine	Mobilité électrophorétique	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Proportion EC/TG	Principales apolipoprotéines
Chylomicrons	Pas de migration	0,93	75-1200	1/19	B48, E
VLDL	préβ	0,93-1,006	30-80	1/3,3	B100, E
IDL	Préβ lent	1,006-1,019	27-35	1/3,5	B100, E
LDL	β	1,019-1,063	18-27	1/0,23	B100
HDL2	α	1,063-1,125	9-12	1/0,22	A-I, A-II
HDL3	α	1,125-1,210	7-9	1/0,19	A-I, A-II
préβHDL	préβ	1,210-1,250	<7	nd	A-I
Lp(a)		1,040-1,115	25		B100, (a)

1-2 Composition des lipoprotéines

Les lipoprotéines comportent un cœur hydrophobe constitué de lipides neutres (esters de cholestérol et triglycérides) recouvert d'une enveloppe amphiphile dont les constituants principaux sont les phospholipides, le cholestérol non estérifié et les apolipoprotéines (Figure 1). Les sous-populations de lipoprotéines se distinguent par leur taille, leur densité mais aussi par la composition lipidique de leur cœur hydrophobe. Les VLDL contiennent principalement des triglycérides alors que les LDL et les HDL contiennent principalement des esters de cholestérol. Ce déséquilibre de composition du cœur hydrophobe constitue un véritable moteur dans le métabolisme des lipoprotéines.

Le cœur hydrophobe est le principal « réservoir » lipidique des lipoprotéines. Les apolipoprotéines, situées à la surface, confère à chaque lipoprotéine son identité, ses propriétés fonctionnelles et son devenir métabolique. La diversité structurale et fonctionnelle des apolipoprotéines est à l'origine de la multiplicité des sous-populations lipoprotéiques. L'identité de chaque lipoprotéine est le fruit de la combinaison de ses apolipoprotéines.

La première classification des apolipoprotéines comprenait 3 subdivisions. Les apolipoprotéines A (apoA) sont principalement associées aux HDL, les apolipoprotéines B (apoB) sont principalement associées aux LDL et les apolipoprotéines C (apoC) aux VLDL et HDL. Cette classification, encore utilisée de nos jours, a considérablement évolué au cours des trente dernières années, en raison de la découverte de nouvelles apolipoprotéines et de profils de distribution spécifiques et complexes au sein des lipoprotéines plasmatiques (Tableau 2). Par exemple, alors que les apoA1 et A2 se localisent quasi exclusivement dans les HDL, l'apoA4, présente dans les HDL, peut aussi s'associer aux lipoprotéines riches en triglycérides. Les apoB se localisent non seulement dans les LDL, mais également dans les VLDL et les chylomicrons ; les apoC et E, quant à elles, sont associées à plusieurs types de lipoprotéines et se retrouvent au sein des VLDL et des HDL (Tableau 2).

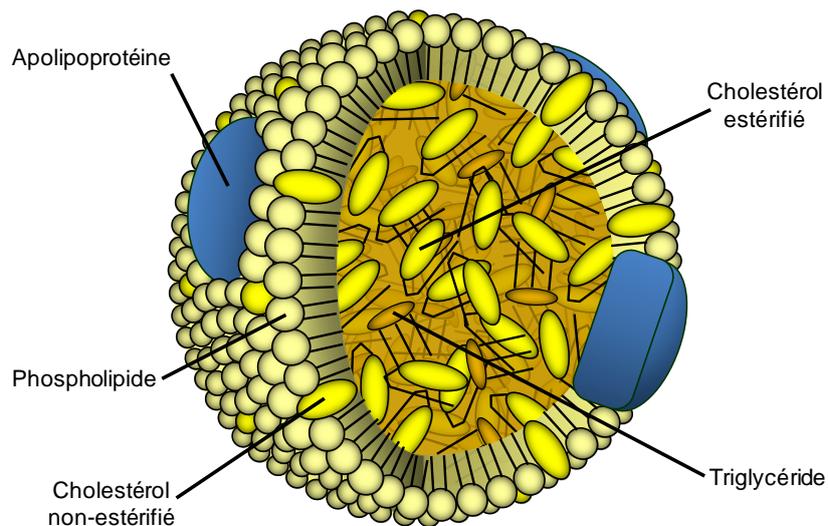


Figure 1. Structure générale d'une lipoprotéine.

Les propriétés physicochimiques des apolipoprotéines jouent un rôle majeur de stabilisation de l'édifice lipoprotéique. Mais ce sont surtout leurs propriétés fonctionnelles qui ont suscité un intérêt majeur au cours des trois dernières décennies. Le clonage et le séquençage d'un grand nombre d'apolipoprotéines ont permis l'identification de motifs structuraux et fonctionnels bien définis. Certaines apolipoprotéines, en particulier les apoA, C et E, partagent des séquences et une organisation génomiques communes indiquant qu'elles sont probablement toutes issues d'un gène ancestral commun. Ce dernier se rapprocherait du gène codant l'apolipoprotéine C1 (apoC1) (1) qui se trouve être l'apolipoprotéine ayant l'organisation génomique et la structure les plus simples. Ainsi, au cours de l'évolution, les gènes codant les apolipoprotéines ont acquis des séquences distinctes, probablement par l'intermédiaire de duplications et translocations multiples, partielles ou complètes, du motif ancestral commun, conférant, à chacune d'entre elles, sa spécificité fonctionnelle telle que l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines, leur interaction avec les récepteurs cellulaires spécifiques, ou encore l'activation et l'inhibition d'enzymes impliquées dans leur métabolisme intravasculaire (Tableau 2).

Tableau 2. Principales apolipoprotéines humaines : expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction.

Nom	Tissu	Distribution	Fonction
ApoA1	Foie, intestin	Chylomicrons, HDL	Structurelle Activateur physiologique de la LCAT Efflux de cholestérol
ApoA2	Foie, intestin	HDL	Structurelle Modulateur de la HL Efflux de cholestérol
ApoA4	Foie, intestin	Chylomicrons, HDL	Transport reverse du cholestérol Activateur de la LCAT Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
ApoA5	Foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en TG
ApoB100	Foie	VLDL, IDL, LDL	Structurelle Synthèse et sécrétion des VLDL Ligand du récepteur LDLR
ApoB48	Intestin	Chylomicrons	Structurelle Synthèse et sécrétion des chylomicrons Ligand du récepteur B48R
ApoC1	Foie, (intestin)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP Activateur de la LCAT Inhibiteur de la liaison aux LDLR, LRP, VLDLR
ApoC2	Foie, (intestin)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Activateur physiologique de la LPL
ApoC3	Foie, (intestin)	Chylomicrons, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la LPL Inhibe la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG
ApoD (apoA3)	Foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport reverse du cholestérol (?)
ApoE	Foie, macrophage, cerveau	Chylomicron, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDLR et LRP
ApoF	Foie	LDL (VLDL, HDL)	Inhibiteur de la CETP
ApoG		HDL	?
ApoH (β2 glycoprotéine I)		HDL	?
ApoJ (clusterine)		HDL	Anti-inflammatoire
ApoL		HDL	Immunité innée
ApoM		HDL	Génération des pré β HDL (?)
ApoSAA		HDL, chylomicrons	Phase aiguë de l'inflammation

VLDL: very low density lipoproteins; IDL: intermediate density lipoproteins; LDL: low density lipoproteins; HDL: high density lipoproteins; CETP: cholesteryl ester transfer protein; LRP: LDL receptor-related protein; LPL: lipoprotein lipase; LCAT: lecithin/cholesterol acyltransferase; HL: hepatic lipase.

1-3 Trafic intravasculaire des lipoprotéines

Les lipoprotéines subissent des remaniements constants durant leur transit intravasculaire sous l'influence des apolipoprotéines, des enzymes lipolytiques, des protéines de transfert des lipides et des récepteurs cellulaires. Les études structurales et fonctionnelles ont permis de décrypter l'implication précise de chacune des particules lipoprotéiques dans le transport intravasculaire des lipides (Figure 2). Trois grands types de tissus jouent un rôle majeur dans le métabolisme des lipoprotéines : l'intestin, le foie et les tissus périphériques.

L'intestin permet l'absorption des lipides d'origine alimentaire et leur intégration dans les chylomicrons, lipoprotéines de grande taille et riches en TG synthétisées au sein des entérocytes. Les chylomicrons sont sécrétés par l'intestin dans le système lymphatique avant de rejoindre le système vasculaire. Ils contribuent au transport entérohépatique des lipides. Les triglycérides des chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), libérant ainsi des acides gras d'origine alimentaire. Ces derniers sont soit captés par les tissus périphériques pour y être stockés (notamment dans le tissu adipeux), soit dégradés à des fins énergétiques (notamment dans le muscle strié).

Le foie constitue l'organe central de gestion du métabolisme et du transport des lipides dans l'organisme. Il prend en charge les lipides résiduels d'origine intestinale présents dans les particules résiduelles de chylomicrons (ou chylomicrons remnants). Puis, les lipides captés par le foie sont intégrés dans de nouvelles lipoprotéines, les VLDL, afin de les redistribuer aux différents tissus périphériques qui en ont besoin. Cette voie centrifuge, du foie vers les tissus périphériques (incluant tous les tissus à l'exclusion du foie et de l'intestin) consiste en une cascade impliquant les VLDL, les IDL et les LDL.

Enfin, les tissus périphériques peuvent acquérir des lipides, par le biais de l'hydrolyse des triglycérides et de l'endocytose, des lipoprotéines d'origine hépatique ou intestinale. Contrairement au foie, la plupart des tissus périphériques sont incapables de métaboliser le cholestérol qu'ils ont acquis ou qu'ils ont produit eux-mêmes. Afin de maintenir un état d'homéostasie, l'élimination du cholestérol excédentaire des tissus périphériques requiert donc une voie de transport spécifique, centripète, qui consiste, via les HDL, en un retour au foie, seul organe capable de le cataboliser et/ou de l'excréter par voie biliaire (Figure 2).

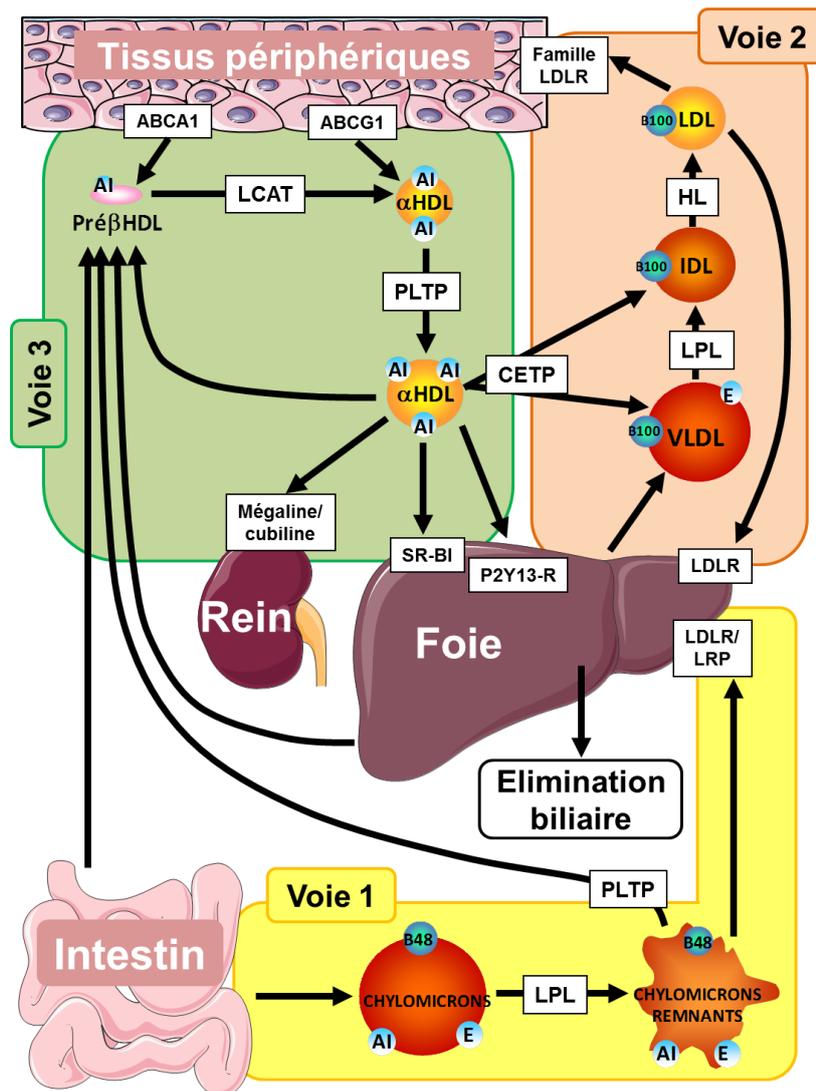


Figure 2. Les trois voies du transport intravasculaire du cholestérol.

Les trois types de tissus sont à considérer du point de vue de métabolisme des lipides : l'intestin permet l'absorption des lipides exogènes, le foie, organe central assure la distribution et l'élimination du cholestérol de l'organisme et les tissus périphériques utilisent le cholestérol à des fins structurales (constitution des membranes cellulaires) ou métaboliques (synthèse d'hormones stéroïdiennes ou de vitamine D). Les lipoprotéines assurent le transport intravasculaire du cholestérol entre ces trois types d'organes selon trois voies distinctes. La voie entérohépatique (voie 1) : les lipides alimentaires absorbés par l'intestin permettent l'assemblage et la sécrétion de chylomicrons riches en triglycérides. Sous l'action de la LPL qui hydrolyse les triglycérides, les chylomicrons sont convertis en particules résiduelles (remnants) captées par le foie. La voie d'apport endogène (voie 2) : le foie sécrète de nouvelles lipoprotéines riches en triglycérides, les VLDL. Les triglycérides vont de nouveau être hydrolysés par la LPL, provoquant la conversion de VLDL en IDL, qui, sous l'action de la lipase hépatique, vont perdre leur contenu résiduel en triglycérides pour former des LDL majoritaires dans le plasma humain et principaux transporteurs du cholestérol jusqu'aux tissus périphériques. La voie de retour (voie 3) : les HDL assurent le retour du cholestérol excédentaire des tissus périphériques vers le foie. L'étape initiale est induite par les HDL naissantes, ou préβHDL, qui servent d'accepteurs pour l'efflux de cholestérol cellulaire via le transporteur ABC-A1. Dans un second temps, le cholestérol libre capté par les préβHDL est estérifié sous l'action de la LCAT, provoquant la conversion des préβHDL en particules αHDL matures et comportant un cœur lipidique hydrophobe constitué essentiellement d'esters de cholestérol. L'efflux de cholestérol peut se poursuivre vers les HDL matures, notamment grâce au transporteur ABC-G1. Les αHDL peuvent alors subir un remodelage sous l'effet de deux protéines de transfert : la PLTP favorise la formation de HDL de grande taille alors que la CETP assure le transfert de cholestérol des HDL vers les VLDL et les IDL. Dans une dernière étape, le cholestérol transporté par les HDL est capté de manière sélective par le récepteur SR-BI au niveau du foie (il peut également être capté par l'intermédiaire du récepteur P2Y13) en vue de son excrétion biliaire et les particules HDL résiduelles ont également la possibilité d'être éliminées au niveau rénal par des récepteurs de type cubiline/mégaline.

2- Prise en charge des lipides exogènes par l'intestin et transport vers le foie : Voie entérohépatique

2-1 Absorption intestinale de lipides d'origine alimentaire

De nombreuses protéines cellulaires influencent de manière positive ou négative, l'absorption des acides gras et du cholestérol par les entérocytes (Tableau 3).

La contribution exacte de ces protéines à l'absorption nette des acides gras alimentaires est encore mal définie et l'utilisation de modèles *in vivo* n'a pas permis à ce jour de mettre en évidence un transporteur indispensable à l'absorption des acides gras. Ces observations laissent supposer que ces différentes protéines aient des rôles redondants ou que les phénomènes de diffusion passive transmembranaires puissent jouer un rôle non négligeable dans l'absorption des acides gras indépendamment de transporteurs protéiques.

Concernant l'absorption du cholestérol, plusieurs protéines sont susceptibles de jouer un rôle, parmi lesquels *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1), récemment proposé comme étant le principal responsable de l'absorption intestinale de cholestérol, celle-ci étant réduite de 70% chez les animaux NPC1L1-déficients (2).

2-2 Assemblage des chylomicrons

L'apoB48 et la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) sont également des protéines clés de l'absorption des lipides alimentaires. Elles jouent un rôle essentiel dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides, qu'il s'agisse des chylomicrons dans l'entérocyte ou des VLDL dans l'hépatocyte (3-5).

L'apoB48, synthétisée par les entérocytes, constitue le site primordial de lipidation pour la formation des chylomicrons dans le réticulum endoplasmique et est indispensable à leur stabilisation. Les protéines apoB48 qui ne sont pas rapidement lipidées présentent des défauts de conformation qui les orientent vers une destruction par protéolyse.

La MTP est une protéine intracellulaire de transfert des lipides (préférentiellement esters de cholestérol et triglycérides) localisée dans le réticulum endoplasmique. Elle contribue à stabiliser l'apoB à un stade précoce de sa synthèse. Chez les sujets souffrant d'abétalipoprotéïnémie, ainsi que chez les souris génétiquement modifiées MTP-déficientes, une malabsorption sévère des graisses est associée à l'absence quasi complète de chylomicrons et de VLDL plasmatiques (3-5). Dans des conditions normales, la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides dans les entérocytes, en phase postprandiale, sont directement fonction du taux d'absorption des lipides. Les chylomicrons prennent en

charge et transportent également le cholestérol libre alimentaire qui est estérifié au sein des entérocytes par une enzyme spécifique localisée dans le réticulum endoplasmique l'*acylcoenzyme A cholestérol acyltransférase* (ACAT). Le cœur hydrophobe des chylomicrons est constitué majoritairement de triglycérides et la proportion relative d'esters de cholestérol et de triglycérides est directement dépendante des taux d'absorption des acides gras et du cholestérol au niveau du tube digestif.

Après leur assemblage dans le réticulum endoplasmique, les chylomicrons sont ensuite concentrés au sein de l'appareil de golgi dans des vésicules de sécrétion qui vont migrer, puis fusionner avec la membrane plasmique au pôle basolatéral de l'entérocyte afin d'être déversées dans l'espace extracellulaire.

Tableau 3. Transporteurs et protéines impliqués dans la prise en charge intestinale des lipides

Protéine	Ligand	Fonction
FABPpm	Acides gras, lysoPC, cholestérol	Absorption ?
Système cavéoline1/annexine2	Acides gras, cholestérol	Absorption ?
CD36 (FAT)	Acides gras	Absorption ?
FATP	Acides gras	Absorption ?
SR-BI	Cholestérol	Absorption
NPC1L1	Cholestérol	Absorption
ABC (types A1, G5, G8)	Cholestérol, sitostérol	Excrétion (surtout sitostérol)
ApoB	EC, TG, PL	Structure des lipoprotéines riches en TG
MTP	EC, TG, PL	Assemblage et sécrétion des lipoprotéines riches en TG

FABPpm : plasma membrane fatty acid-binding protein ; *FAT* : fatty acid translocase ; *FATP* : fatty acid transport protein ; *SR-BI* : scavenger receptor class BI ; *NPC1L1* : Niemann-Pick CI-like 1 ; *ABC* : ATP-binding cassette ; *MTP* : microsomal triglyceride transfer protein ; *EC* : esters de cholesterol ; *TG* : triglycérides ; *PL* : phospholipides

2-3 Métabolisme intravasculaire des chylomicrons

Les chylomicrons d'origine intestinale, initialement sécrétés dans la lymphe mésentérique, rejoignent la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière gauche. En plus de l'apoB48, qui ne peut pas s'échanger librement entre les lipoprotéines circulantes, les chylomicrons natifs contiennent également les apoA1, A2 et A4 nouvellement synthétisés et ils acquièrent rapidement les apoC et E provenant des HDL. Ils sont ensuite métabolisés en deux étapes : hydrolyse des triglycérides par la LPL puis captage des particules résiduelles par les tissus périphériques et le foie.

Les chylomicrons, une fois dans le compartiment intravasculaire, peuvent se lier très rapidement à la LPL. Cette enzyme est ancrée à l'endothélium des capillaires sanguins de nombreux tissus périphériques (tissu adipeux, cœur, muscle squelettique, cerveau) (6) (Tableau 4) (Figure 3). L'apoC2 localisée à la surface des VLDL est un cofacteur puissant de

la LPL. Une fois activée, la LPL hydrolyse les TG du cœur hydrophobe des chylomicrons, libérant des acides gras, rapidement captés par les tissus. Des mutations entraînant un déficit en LPL ou en apoC2 fonctionnelles sont associées, chez l'homme, à des formes rares d'hyperchylomicronémie familiale et montrent que ces deux protéines sont des facteurs clés du catabolisme des chylomicrons (7). A l'inverse de l'apoC2, l'apoC3 exerce un effet inhibiteur sur la LPL. De manière concomitante à la libération d'acides gras, l'hydrolyse des TG du cœur hydrophobe entraîne une redondance des composés de surface, facilitant la dissociation des apoA (en particulier l'apoA1) et C. Ces dernières contribuent à l'émergence de nouvelles particules HDL. Cette étape de formation de particules HDL naissantes, riches en protéines et pauvres en lipides, constitue une étape clé dans la voie de retour du cholestérol excédentaire des tissus périphériques vers le foie.

Après l'hydrolyse, une partie des particules résiduelles de chylomicrons peuvent être directement internalisées par les tissus périphériques, principalement le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux (8). Les particules résiduelles de chylomicrons non captées au niveau périphérique sont catabolisées par les hépatocytes par l'intermédiaire d'une endocytose récepteur-dépendante (Tableau 5). Dans le foie, le récepteur des LDL (LDL-R) et le récepteur *LDL receptor-related protein* (LRP) contribuent tous deux majoritairement à la reconnaissance et à l'internalisation des particules résiduelles de chylomicrons qui contiennent de l'apoE (8). Après fusion avec des lysosomes, la particule résiduelle internalisée subit finalement une lipolyse et une protéolyse quasi complète. A la suite de cette hydrolyse, le cholestérol libéré peut alors connaître deux destinées : soit être excrété dans les canalicules biliaires, directement sous forme de cholestérol libre ou après conversion en acides biliaires ; soit être intégré dans de nouvelles lipoprotéines assemblées et sécrétées par le foie, les VLDL.

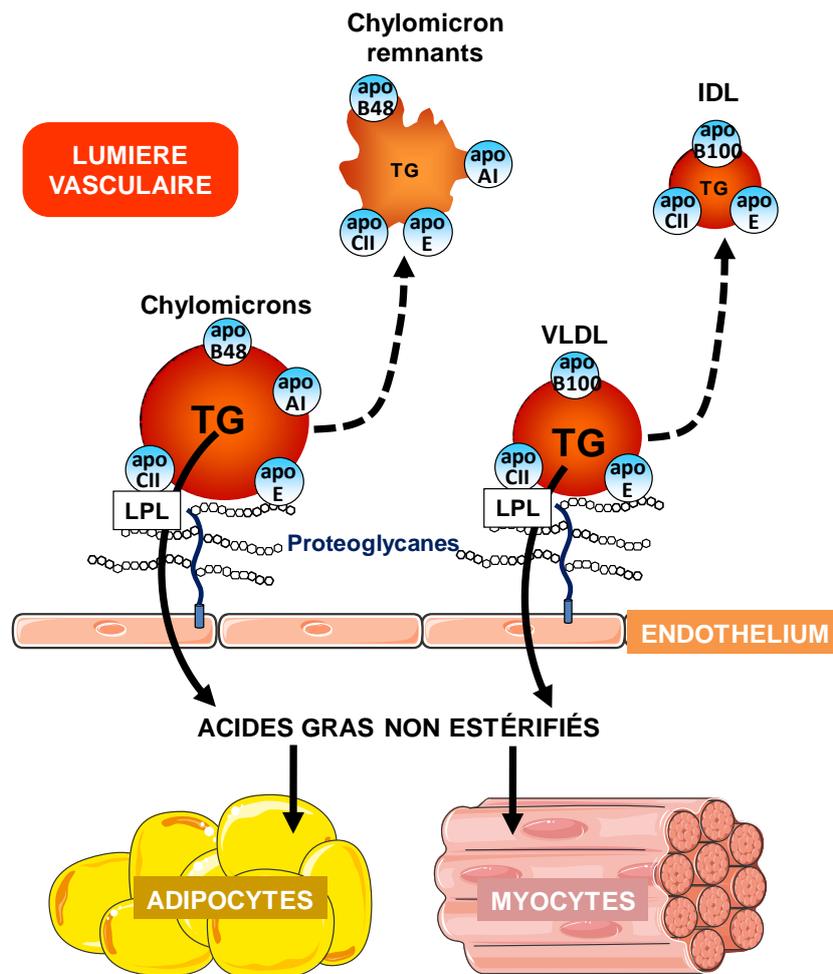


Figure 3. Action de la lipoprotéine lipase (LPL) sur les lipoprotéines plasmatiques riches en TG (chylomicrons, VLDL).

La LPL est liée aux groupes « héparane sulfate » de protéoglycans ancrés à la surface des cellules endothéliales bordant la lumière vasculaire. En présence d'apoC2, son co-facteur localisé à la surface des lipoprotéines, la LPL hydrolyse les TG du cœur hydrophobe des chylomicrons et des VLDL. La LPL provoque ainsi la libération d'acides gras non estérifiés qui seront captés par les tissus sous-jacents. Elle conduit en outre à la formation de particules résiduelles (remnants) de chylomicrons et de particules IDL appauvries en TG.

3- Transport des lipides du foie vers les tissus périphériques : voie endogène d'apport

Les VLDL synthétisés et sécrétés par le foie sont à l'origine de la voie dite « endogène » de transport des lipides puisqu'elle permet leur transport du foie vers les tissus périphériques. A nouveau, la LPL, secondée ensuite par la lipase hépatique (*hepatic lipase* HL), initie une cascade lipolytique générant des IDL et des LDL à partir des VLDL hépatiques. Ainsi les lipoprotéines contenant l'apoB100 s'appauvrissent progressivement en triglycérides et s'enrichissent en esters de cholestérol sous l'action de la protéine de transfert des esters de cholestérol (*cholesterol ester transfer protein* CETP). Les LDL produits finaux de cette cascade métabolique, sont les principaux transporteurs du cholestérol dans l'espace intravasculaire. Elles permettent notamment d'apporter du cholestérol aux tissus périphériques.

3-1 Assemblage des VLDL

Les mécanismes moléculaires de synthèse et de sécrétion des lipoprotéines riches en TG au niveau du foie sont similaires à ceux de l'intestin : les hépatocytes élaborent ces particules dans le réticulum endoplasmique et les intègrent à des vésicules de sécrétion localisées dans l'appareil de Golgi (9,10). L'apoB est également essentielle à l'assemblage des VLDL dans le foie. Cependant c'est l'apoB100 et non pas sa forme tronquée B48 intestinale, qui est intégrée aux VLDL hépatiques. Là encore, l'assemblage et la sécrétion de ces lipoprotéines requièrent la présence de la MTP (3). La *phospholipid transfer protein* (PLTP) semble également jouer un rôle essentiel dans ce processus même si son mode d'action est encore non élucidé (11). Les apoC et E sont synthétisées essentiellement dans le foie et sont associées aux VLDL naissantes.

Les triglycérides, composant majeur du cœur hydrophobe des VLDL ne sont pas d'origine alimentaire comme pour les chylomicrons, mais sont synthétisés majoritairement à partir des acides gras non estérifiés qui proviennent essentiellement du tissu adipeux (12).

Le cholestérol est présent dans le cœur hydrophobe sous forme d'esters de cholestérol, produits par l'ACAT hépatique. La quantité relative d'esters de cholestérol transportés par les VLDL hépatiques est directement fonction de l'activité de l'ACAT, elle-même dépendante du niveau de cholestérol intrahépatocytaire.

3-2 Remodelage des VLDL : Cascade VLDL-IDL-LDL

Après sécrétion dans le compartiment intravasculaire, les VLDL hépatiques connaissent le même devenir que les chylomicrons d'origine intestinale. Elles se lient à la surface de l'endothélium vasculaire à la LPL qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides et la libération d'acides gras, captés par les tissus sous-jacents (Figure 3). La réduction progressive du cœur hydrophobe s'accompagne du transfert de phospholipides et d'apoC aux HDL. Cette première étape conduit à la formation transitoire de particules IDL. Les IDL, partiellement appauvries en TG et de taille inférieure aux VLDL subissent une hydrolyse de leur cœur hydrophobe sous l'action de la HL. Les LDL, enrichies en esters de cholestérol et pauvres en triglycérides, sont alors générés. A la différence des VLDL et des IDL, les LDL ne contiennent à leur surface que l'apoB100. L'enrichissement du cœur hydrophobe des LDL en esters de cholestérol est la conséquence directe de 2 phénomènes : la perte de triglycérides sous l'effet lipolytique des lipases endothéliales (LPL et HL) et le gain d'esters de cholestérol sous l'effet de la CETP.

Tableau 4.

Principales enzymes et protéines de transfert impliquées dans le remodelage des lipoprotéines dans le compartiment intravasculaire

Protéine	Principale localisation	Fonction
LPL	Endothélium	Hydrolyse des TG, des chylomicrons et des VLDL
HL	Endothélium	Hydrolyse des TG, des phospholipides, des VLDL remnants, IDL, LDL et HDL.
EL	Endothélium	Hydrolyse des phospholipides et des HDL
LCAT	HDL	Estérification du cholestérol, des HDL (activité α LCAT) et des LDL (activité β LCAT)
CETP	HDL	Transfert des esters de cholestérol, des TG et des phospholipides
PLTP	HDL	Transfert des phospholipides, lipopolysaccharides, diacylglycérides, cholestérol libre, α -tocophérol
PON1	HDL	Hydrolyse des lipides oxydés pro-inflammatoires
PAF	HDL, LDL, Lp(a)	Hydrolyse du PAF et de dérivés lipidiques hydroperoxydés
sPLA2	HDL	Hydrolyse des phospholipides

LPL : *lipoprotein lipase* ; HL : *hepatic lipase* ; EL : *endothelial lipase* ; LCAT : *lecithin/cholesterol acyltransferase* ; CETP : *cholesteryl ester transfer protein* ; PLTP : *phospholipid transfer protein* ; PON1 : *paraoxonase* ; PAF : *plasma platelet activating factor* ; sPLA2 : *secretory phospholipase A2*.

3-3 Clairance des VLDL, IDL et LDL

Les lipoprotéines VLDL, IDL et LDL peuvent être retirées de la circulation à tout moment, par le biais d'interactions avec des récepteurs cellulaires spécifiques appartenant à la famille du récepteur aux LDL (LDLR) qui assurent ainsi l'incorporation finale des lipides d'origine hépatique par les tissus destinataires (Tableau 5). Ces récepteurs sont localisés au niveau des tissus périphériques (récepteur LDL, récepteur VLDL, récepteur LRP, récepteur ER2 à l'apoE, megaline) et au niveau hépatique (récepteur des LDL, récepteur LRP) (8). Le foie peut ainsi réabsorber une partie des lipoprotéines qu'il a lui-même générées.

Tous les membres de la famille des LDLR possèdent une organisation commune comprenant une partie intracellulaire, une partie transmembranaire et une partie extracellulaire. Ces récepteurs ont une grande homologie de structure, mais les modalités de liaison aux lipoprotéines varient selon qu'il s'agisse des VLDL (reconnaissance par l'apoE) ou des IDL et des LDL (reconnaissance par l'apoB100). Ces spécificités sont dues à des modifications conformationnelles au sein des VLDL (lipoprotéines de grande taille, riches en triglycérides) ou des LDL (lipoprotéines de petite taille, riches en esters de cholestérol). Elles rendent accessibles ou non les motifs des apoB et E reconnus par les récepteurs.

Les récepteurs de la famille du LDLR initient une voie cellulaire d'endocytose et de catabolisme des particules selon des modalités communes entre les différents membres. Le mécanisme cellulaire impliqué, universel et retrorégulé, a été identifié par Brown et Goldstein (prix Nobel de médecine en 1985) (13) (Figure 4). Leurs travaux distinguent les étapes essentielles de l'internalisation des LDL via leur récepteur cellulaire.

Dans un premier temps, les LDL circulantes se fixent sur leur récepteur localisé au niveau de zones spécialisées de la membrane plasmique associées à la clathrine : les puits recouverts (13).

Dans un second temps, les LDL sont internalisées par endocytose dans des vésicules qui fusionnent avec des lysosomes où tous les constituants lipidiques et protéiques sont dégradés. Avant le stade ultime de dégradation, les récepteurs aux LDL se dissocient de leur ligand et ont la possibilité d'être recyclés vers la membrane plasmique.

Ce mécanisme assure à la cellule un approvisionnement substantiel en cholestérol qui va, dans un dernier temps, exercer une action régulatrice :

- En augmentant l'activité d'estérification et donc de stockage du cholestérol via la LCAT, limitant ainsi l'accumulation de cholestérol libre, toxique pour la cellule à fortes doses

- En inhibant la synthèse endogène du cholestérol par l'inhibition de l'hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA)-réductase, enzyme clé dans la voie de biosynthèse
- En réprimant l'expression des récepteurs LDL et donc en bloquant la voie principale d'entrée du cholestérol dans la cellule (13)

Ces deux derniers mécanismes permettent une régulation fine du pool cellulaire de cholestérol et sont sous le contrôle des facteurs de transcription *sterol response element-binding protein* (SREBP) et plus particulièrement SREBP-2, qui agit comme un véritable senseur, activé en cas de diminution du cholestérol intracellulaire (14).

SREBP-2 est synthétisé dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'un précurseur inactif de 125 kDa. Il subit ensuite un clivage protéolytique de son domaine NH₂-terminal qui permet la formation de sa forme active (15,16). SREBP-2 activé entre alors dans le noyau puis initie la transcription en se liant au *sterol regulatory element* (SRE) de plusieurs gènes d'homéostasie du cholestérol, à savoir les gènes du LDL-R, de l'HMG coA synthase et réductase, de la squalene synthase et de SREBP-2 (14,17,18).

Il a été démontré que SREBP-2 pouvait subir une polyubiquitination suivie d'une dégradation par le protéasome (19). Ainsi, l'inhibition du protéasome entraîne une accumulation de SREBP-2 et une augmentation du nombre de LDL-R (19,20).

Un mécanisme supplémentaire de régulation fait intervenir la *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* (PCSK9). Il a été démontré que le taux plasmatique de PCSK9 influence directement les taux circulants de LDL (21,22).

PCSK9 agit en diminuant le nombre de LDL-R à la surface des hépatocytes (23–29). De nombreuses études animales de surexpression, de sous expression ou de déficit en PCSK9 ont clairement montré que PCSK9 intervenait sur la dégradation du LDL-R (24–27,30,31). De manière plus précise, il a été démontré (32) que PCSK9 est principalement sécrétée par le foie, puis libérée dans le plasma où elle se lie au LDL-R via le domaine extracellulaire EGFA de ce dernier (33,34). Le complexe PCSK9-LDL-R est ensuite internalisé par un phénomène d'endocytose puis dégradé dans le lysosome (Figure 4).

De manière similaire au LDL-R, l'expression de PCSK9 est modulée par les taux intracellulaires de cholestérol. Cette modulation est liée de manière prédominante au facteur de transcription SREBP2 (27,35–39). Il a également été démontré que le facteur de transcription HNF1a pouvait stimuler l'expression du gène de PCSK9 (39,40).

L'étude des causes génétiques associées aux hypercholestérolémies autosomales dominantes, caractérisées par des taux anormalement élevés de LDL-cholestérol, a permis d'élucider plusieurs points du mécanisme de fonctionnement et de régulation du récepteur aux LDL décrit par Brown et Goldstein, prouvant par là-même son importance physiologique chez l'homme.

La reconnaissance des particules VLDL et LDL natives peut également être effectuées par un récepteur de type « éboueur » (scavenger) : le récepteur SR-BI (Tableau 5). Il a initialement été mis en évidence sa capacité à lier les particules HDL natives et à promouvoir la captation sélective par divers types cellulaires des esters de cholestérol des HDL (41). A côté de son rôle crucial dans le métabolisme des HDL, le récepteur SR-BI est également susceptible de lier les particules VLDL, IDL et LDL natives. Ce récepteur possède une structure très différente de celle de la famille du LDLR. Il comprend deux domaines transmembranaires reliés par une boucle extracellulaire fortement glycosylée. De plus, le mécanisme de captation impliqué diffère également de celui des LDLR. Le captage sélectif des esters de cholestérol issu des HDL, mais aussi des VLDL, IDL et LDL, se déroule sans endocytose complète ni dégradation lysosomale des particules. L'augmentation de clairance des VLDL, IDL et LDL facilité par les récepteurs SR-BI s'expliquerait par l'appauvrissement progressif de ces lipoprotéines en esters de cholestérol (42).

Ces récepteurs de la famille du LDLR et SR-BI sont impliqués dans le métabolisme normal des lipoprotéines à apoB. En cas d'accumulation de lipoprotéines modifiées, suite notamment à un temps de résidence prolongée dans le compartiment plasmatique, d'autres types de récepteurs, notamment de type scavenger différents de SR-BI (Tableau 5) peuvent entrer en jeu et favoriser l'accumulation de lipides dans la paroi vasculaire.

Tableau 5.

Récepteurs cellulaires des lipoprotéines

Nom	Famille	Localisation principale	Lipoprotéines liées	Sites de reconnaissance
LDLR	LDL-receptor	Foie, muscle, cerveau, cœur,...	LDL, VLDL, chylomicrons remnants	ApoB100, E
LRP	LDL-receptor	Foie, cerveau, poumons, ...	VLDL, chylomicrons remnants	ApoE
VLDLR	LDL-receptor	Muscle, cœur, tissu adipeux	VLDL, chylomicrons remnants	ApoE
ApoER-2	LDL-receptor	Cerveau, placenta	VLDL, chylomicrons remnants	ApoE
Mégaline	LDL-receptor	Rein, intestin, placenta	HDL, LDL, VLDL	ApoE, B100, A-I
Cubiline		Rein, intestin, placenta	HDL	ApoA-I
SR-AI/AII	Scavenger receptor class A	Macrophages, endothélium	LDL acétylés, LDL oxydées	Polyanions
SR-BI	Scavenger receptor class B	Foie, tissus stéroïdogènes	HDL, LDL	apoA-1, B
CD36	Scavenger receptor class B	Monocytes, endothélium, plaquettes, adipocytes, cellules musculaires lisses	LDL modérément oxydées	
SREC		Cellules endothéliales	LDL oxydées, LDL acétylés	
LOX1	Lectin	Macrophages, cellules endothéliales	LDL oxydées	
B48R		Macrophages, endothélium	Chylomicrons, chylomicrons remnants	ApoB48

LDLR : *LDL-receptor* ; LRP : *LDL-receptor related protein*; VLDLR: *VLDL-receptor*; ApoER-2: *apoE-receptor*; SR-AI/AII: *scavenger receptor class AI/AII*; SR-B1: *scavenger receptor class BI*; CD36: *glycoprotein IV*; SREC: *scavenger receptor express by endothelial cells*; LOX1: *lectin-like oxidized LDL receptor*; B48R: *apoB48 receptor*

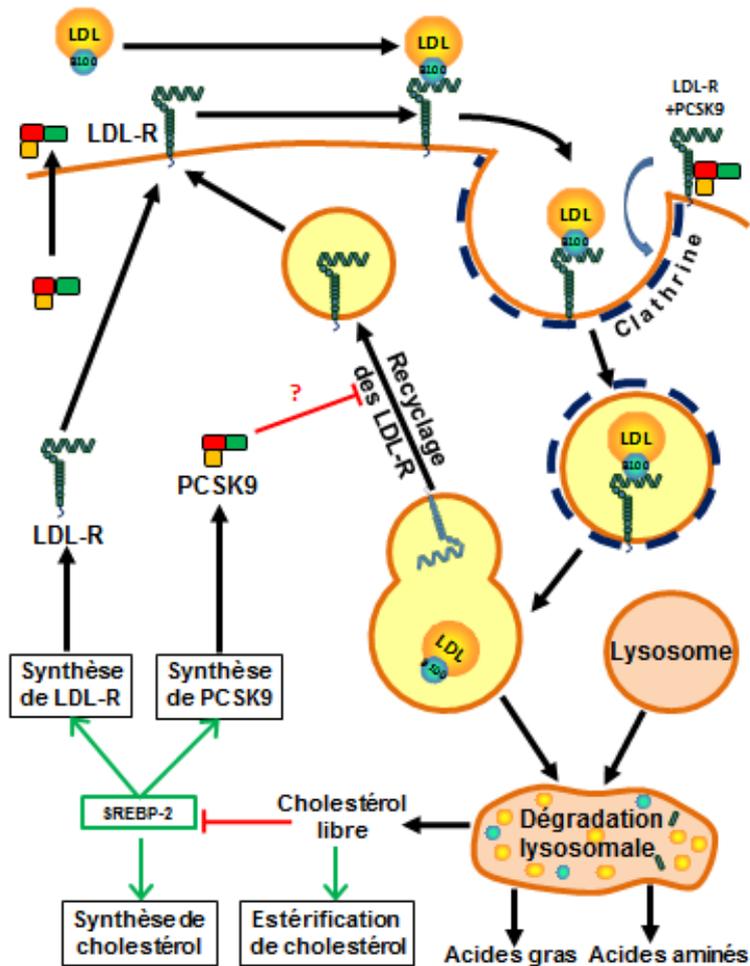


Figure 4. Endocytose et dégradation des lipoprotéines de basse densité (LDL) : modèle de régulation de Brown et Goldstein.

La première phase implique la fixation des LDL à leur récepteur membranaire (LDL-R) par l'intermédiaire de l'apoB100. Les complexes LDL/LDL-R, lorsqu'ils se retrouvent au niveau des puits recouverts (présence de clathrine sur la surface intracellulaire de la membrane plasmique), sont ensuite internalisés par endocytose. Les variations de pH dans les vésicules d'endocytose induisent la dissociation des LDL de leurs récepteurs et ces derniers peuvent alors être recyclés vers la membrane plasmique. Les vésicules contenant les LDL fusionnent enfin avec des lysosomes, conduisant à la dégradation enzymatique des différents constituants des lipoprotéines et à la libération d'acides aminés, d'acides gras et de cholestérol libre. Ce dernier va ainsi rejoindre le pool cellulaire de cholestérol et exercer un contrôle de son homéostasie à différents niveaux : stimulation du stockage de cholestérol par estérification, inhibition de l'hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA)-réductase, enzyme clé de la synthèse endogène de cholestérol ; inhibition de la synthèse de nouveaux récepteurs au LDL, diminuant ainsi l'import de cholestérol. Ces deux derniers effets passent par une répression du facteur de transcription sterol response element-binding protein-2 (SREBP-2). La protéin convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), également sous le contrôle de SREBP-2, est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique, libérée dans le plasma. Sa fixation au LDL-R entraîne l'endocytose du couple PCSK9-LDL-R qui est dégradé dans le lysosome.

4- Voie de retour des tissus périphériques vers le foie : concept de transport « reverse » du cholestérol

Les tissus périphériques peuvent acquérir du cholestérol par synthèse endogène de novo ou par importation via les lipoprotéines contenant de l'apoB. Mais ils sont incapables, pour la plupart, de cataboliser le cholestérol. La grande majorité du cholestérol excédentaire de l'organisme est éliminé par le foie, qui assure son excrétion dans la bile sous forme de cholestérol libre ou d'acides biliaires. La voie de retour ou transport « reverse » du cholestérol assure un état d'homéostasie en ramenant le cholestérol en excès au niveau des tissus périphériques vers le foie. Ce concept initialement proposé par Glomset en 1968 (43) a pour acteur clé les HDL. Ce rôle des HDL dans le retour du cholestérol excédentaire des tissus périphériques notamment de la paroi vasculaire explique au moins en partie leurs propriétés anti-athérogènes.

4-1 HDL naissantes : accepteurs initiaux du cholestérol cellulaire

Les HDL naissantes sont les particules lipoprotéiques circulantes les plus rudimentaires, consistant principalement en une molécule d'apoA1 (l'apolipoprotéine majeure des HDL) associée à quelques molécules de phospholipides. Les propriétés physicochimiques très particulières des HDL natives les distinguent des HDL matures selon trois points.

Premièrement, ces molécules, étant virtuellement dépourvues de cœur de lipides neutres, présentent une forme hélicoïdale. Deuxièmement, en raison d'un rapport lipides/protéines très faible, leur densité est très élevée (entre 1,21 et 1,25 g/ml). Troisièmement, contrairement aux HDL matures qui ont une mobilité électrophorétique de type α , les HDL naissantes migrent en pré β , d'où leur appellation courante de pré β HDL. Bien que très minoritaires sur le plan quantitatif dans le compartiment plasmatique (avec seulement 5% de l'apoA1 présente dans les pré β HDL contre près de 95% dans les HDL matures), les pré β HDL sont métaboliquement très dynamiques. Elles permettent l'amorçage du processus de transport « reverse » au niveau des tissus périphériques et ont une vitesse de renouvellement très rapide.

Les mécanismes impliqués dans la génération des pré β HDL sont multiples et encore incomplètement élucidés. Cependant, deux sources sont communément admises :

- la sécrétion directe, en tant que particule préformée, par certains types cellulaires
- la génération en tant que produit résiduel issu du métabolisme intravasculaire des lipoprotéines (Figure 5).

Si la détection de HDL natives dans les différents compartiments subcellulaires reste très difficile, il semble que le foie, organe qui synthétise l'apoA1, soit responsable de la sécrétion de pré β HDL. Ainsi, ces particules ont été détectées dans des perfusats hépatiques (12). L'intestin, autre source d'ApoA1, produit des quantités non négligeables de pré β HDL, soit par sécrétion directe par les entérocytes (44), soit de manière indirecte via les chylomicrons. Dans ce dernier cas de figure, l'apoA1 est initialement associée aux chylomicrons sécrétés par les entérocytes ; les pré β HDL ne sont générés que dans un second temps lorsque l'hydrolyse des triglycérides par la LPL provoque une déstabilisation des chylomicrons. Ce processus libère alors dans l'espace intravasculaire des composants de surface en excès, parmi lesquels des phospholipides et de l'apoA1 qui sont les deux constituants des pré β HDL. A noter que la PLTP (11) joue un rôle important dans ce dernier processus. Enfin, les pré β HDL peuvent être générées secondairement au remodelage intravasculaire des particules α HDL elles-mêmes. En effet, une particule α HDL subit des modifications de structure et de composition continues au cours de son transit intravasculaire. Ainsi, à travers le gain ou la perte de constituants de surface ou du cœur sous l'action de la PLTP, de la CETP, de la HL ou de SR-BI (Figure 5), le remodelage des α HDL va contribuer significativement à la régénération des particules pré β HDL naissantes, selon des mécanismes décrits plus en détail (auparavant).

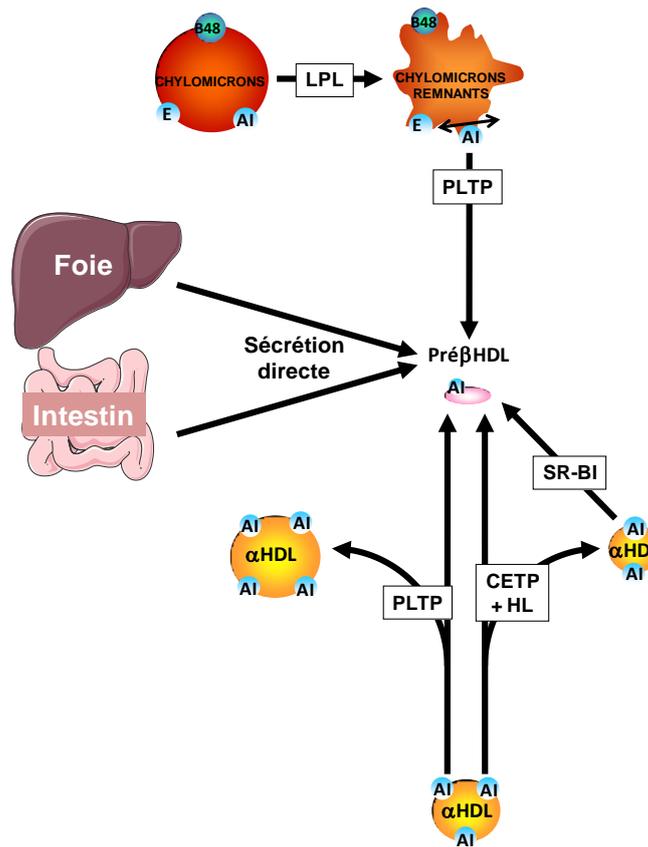


Figure 5. Mécanismes de génération des préβHDL.

Les HDL naissantes ou préβHDL, sont des particules de très petite taille de forme discoïdale. Il existe 3 types de mécanismes de génération des préβHDL : production directe de particules préformées par le foie ou l'intestin ; dissociation de composés de la surface des chylomicrons (et également des VLDL) après hydrolyse des triglycérides par la LPL, avec un effet permissif de la PLTP ; remodelage intravasculaire des HDL par la PLTP, par l'action combinée de la CETP et de l'hépatique lipase (HL) ou encore par le SR-BI.

4-2 Mécanisme d'efflux du cholestérol vers les HDL

La première étape du transport reverse du cholestérol met en jeu le transfert (ou efflux) de cholestérol non estérifié de la membrane plasmique des cellules périphériques vers les accepteurs préβHDL extracellulaires (Figure 6). Une partie de cet efflux pourrait se dérouler sur la base de mécanismes physicochimiques simples impliquant la diffusion passive du cholestérol des structures membranaires (substrats donneurs) jusqu'aux préβHDL (substrats accepteurs) (45). Dans ce modèle, l'orientation des échanges est tributaire du gradient de concentration en cholestérol libre au niveau de la membrane plasmique d'une part et les lipoprotéines acceptrices d'autre part. Par conséquent, la magnitude de la diffusion passive de cholestérol serait une résultante :

- de la composition de l'accepteur
- de la disponibilité du cholestérol libre au niveau de la membrane plasmique de la cellule donneuse, elle-même dépendante de la distribution du cholestérol cellulaire.

Si ce modèle de diffusion passive est justifié d'un point de vue théorique, il reste de cinétique lente et d'efficacité médiocre. En réalité, plusieurs transporteurs protéiques spécifiques existent et permettent de faciliter l'efflux du cholestérol cellulaire.

Au début des années 2000, il a été démontré que le transporteur membranaire ABC-A1 joue un rôle primordial dans l'efflux du cholestérol libre des membranes vers les préβHDL. Ainsi, la maladie de Tangier et d'autres formes familiales d'hypoalphalipoprotéïnémie, caractérisées chez l'homme par un déficit sévère en HDL, sont dues à des mutations au niveau du gène ABC-A1 (46). Cette observation est à l'origine de la découverte du rôle clé d'ABC-A1 dans le métabolisme du cholestérol. Comme toutes les protéines de la famille des transporteurs ABC, ABC-A1 comporte six domaines transmembranaires. ABC-A1 possède une forte affinité pour les préβHDL et lie l'apoA-I faiblement lipidée. Grâce à deux domaines transmembranaires, ABC-A1 utilise de l'ATP comme source d'énergie pour favoriser la translocation de cholestérol libre, mais également de phospholipides, à travers la membrane plasmique. Le transfert vers les préβHDL acceptrices fournit ainsi aux HDL en cours de maturation non seulement du cholestérol (futur constituant du cœur) mais aussi des constituants de surface.

Le récepteur SR-BI pourrait également contribuer dans une certaine mesure à l'efflux du cholestérol cellulaire bien que le mécanisme impliqué et la pertinence physiologique du phénomène soient encore mal définis. Le récepteur SR-BI pourrait ainsi simplement favoriser l'efflux en jouant un rôle d'ancrage des HDL à la membrane plasmique, ou bien stimuler la résorption du cholestérol membranaire présent en fortes quantités au niveau des cavéoles où se localise préférentiellement SR-BI (42,47,48) (Figure 6). Il est à noter que si ABC-A1 a pour ligands des préβHDL faiblement lipidées, le récepteur SR-BI interagit avec des préβHDL plus riches en lipides mais surtout avec des HDL matures (49), laissant à ABC-A1 l'exclusivité de la phase initiale d'efflux de cholestérol.

Plus récemment, l'implication d'un autre transporteur ABC dans l'efflux de cholestérol, ABC-G1, a été mise en évidence dans les macrophages. ABC-G1 possède un mécanisme d'action différent d'ABC-A1. Il ne lie pas directement les lipoprotéines acceptrices et il possède une spécificité pour les α HDL matures. Ce transporteur n'intervient donc pas au niveau des phases précoces d'efflux du cholestérol mais contribuerait à la poursuite de l'enrichissement des α HDL en cholestérol d'origine plasmatique (Fig.6)(50).

Une étude très récente a apporté des preuves de l'implication du système lymphatique dans la voie de retour du cholestérol. Il a été démontré, il y a 10 ans, que la lymphe humaine contenait du HDL-C (51–53). Le transport lymphatique de HDL-C est estimé à plus de 300 mg/jour (54). Une équipe a donc cherché à savoir si le système lymphatique pouvait représenter une voie substantielle d'élimination du cholestérol des tissus périphériques (55). 2 modèles murins d'interruption du drainage lymphatique à partir de la peau ont été mis au point, l'un chirurgical, l'autre génétique par absence de système lymphatique. Le transport reverse du cholestérol a été évalué en utilisant des macrophages marqués avec du cholestérol radioactif. Le transport reverse du cholestérol des macrophages était fortement diminué dans ces 2 modèles. Il a également été montré que cette inhibition du transport reverse du cholestérol était située en amont de l'efflux du cholestérol des macrophages. Il a enfin été démontré que le drainage lymphatique depuis la paroi aortique était impliqué dans le transport reverse du cholestérol. Ces travaux montrent donc que le système lymphatique joue un rôle significatif dans le transport reverse du cholestérol.

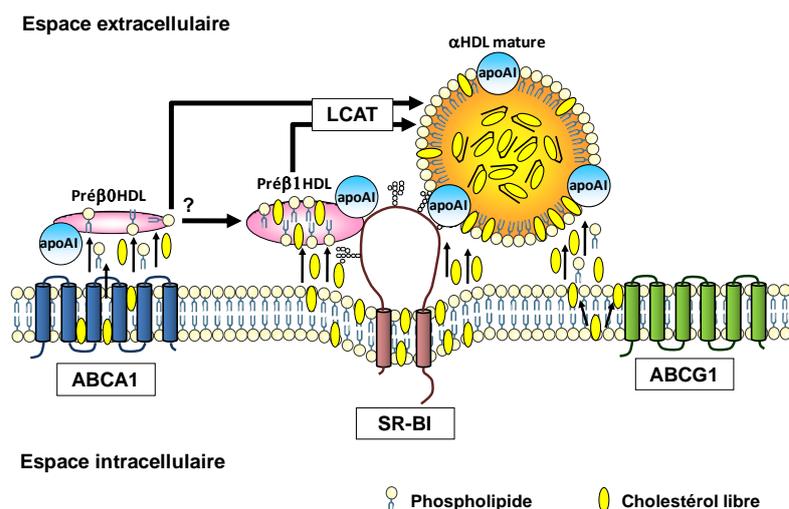


Figure 6. Protéines et mécanismes impliqués dans l'efflux de cholestérol vers les HDL.

La phase initiale de l'efflux est assurée par le transporteur membranaire ATP-binding cassette type A1 (ABC-A1). Celui-ci les HDL natives très faiblement lipidées (préβHDL) par interaction avec l'apoA1 et effectue un transport actif de molécules de cholestérol non estérifiées des pools intracellulaires vers la membrane plasmique, d'où elles sont captées par les préβHDL. Le transporteur ABC-A1 permet également l'efflux de phospholipides membranaires vers les préβHDL, prérequis nécessaire au captage de cholestérol par les particules acceptrices. Dans un second temps, les préβHDL peuvent subir l'action de la LCAT qui, en estérifiant le cholestérol capté, permet la formation du cœur hydrophobe et la génération de HDL matures. Le récepteur SR-BI localisé au niveau des cavéoles serait également capable de favoriser l'efflux de cholestérol, probablement en favorisant l'arrimage des préβHDL partiellement lipidées ou plus vraisemblablement des HDL matures avec les membranes plasmiques. Enfin, le transporteur ABC-G1, au moins au niveau des macrophages, permet l'efflux de cholestérol et de phospholipides vers les HDL matures sans interagir avec l'apoA1.

4-3 Formation des HDL matures

La deuxième phase du transport reverse du cholestérol se déroule dans le compartiment intravasculaire et fait intervenir une enzyme plasmatique spécifique, la LCAT, qui conditionne le devenir métabolique du cholestérol pris en charge par les préβHDL (Figure 7). Cette enzyme est sécrétée dans la circulation principalement par le foie et interagit avec les HDL, au niveau desquelles elle trouve son cofacteur naturel, l'apoA1. Associée aux HDL et stimulée par l'apoA1, la LCAT catalyse l'estérification du cholestérol libre. Les molécules de cholestérol, initialement localisées à la surface de la particule HDL au contact de l'eau lorsqu'elles sont non estérifiées, migrent après estérification vers le cœur hydrophobe de la lipoprotéine (56). La LCAT, par son action, est à l'origine de la conversion des préβHDL, discoïdales, en particules αHDL, sphériques et pourvues d'un cœur hydrophobe. D'autre part, la réaction de transestérification catalysée par la LCAT provoque l'appauvrissement de la surface des HDL en cholestérol mais également en phospholipides (donneurs des groupes acyl nécessaires à la réaction). En résulte la restauration du captage de molécules de cholestérol et de phospholipides additionnelles par les particules en cours de maturation, assurant de cette

manière le flux net de cholestérol des tissus donneurs vers les HDL acceptrices suivant la loi d'action de masse.

Au-delà de son rôle clé dans la maturation des HDL, la LCAT est un acteur central dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol non seulement dans le compartiment cellulaire mais aussi au niveau tissulaire. Ainsi, la majorité des esters de cholestérol circulants dans le sang est générée par la LCAT. D'autre part, une déficience sévère en LCAT, associée notamment au syndrome *fish eye disease*, se traduit chez l'homme par une accumulation de cholestérol dans les tissus périphériques, une quasi-absence des HDL, des VLDL et des LDL de composition anormale, et s'accompagne de l'apparition de lipoprotéines de structure aberrante appelées lipoprotéines X pour certaines mutations (57,58). Toutefois, ces déficits ne sont pas systématiquement associés à une augmentation du risque cardiovasculaire chez l'homme. L'utilisation de souris transgéniques pour la LCAT, qui présentent une augmentation du cholestérol HDL et une distribution hétérogène de ces particules (59), n'a pas davantage permis de déterminer clairement si la LCAT est pro- ou anti-athérogène, les effets semblant largement dépendants du contexte métabolique (60,61).

4-4 Remodelage des HDL

Les esters de cholestérol générés par la LCAT et localisés au cœur des particules α HDL sont non échangeables spontanément par simple diffusion à travers la phase aqueuse qui environne la particule. Ils peuvent donc demeurer nichés au sein de la particule HDL porteuse jusqu'à leur prise en charge par les tissus cibles, notamment le foie. Cependant, chez l'homme et contrairement aux rongeurs, les esters de cholestérol ne demeurent pas associés aux HDL. Ils sont en effet transférés aux lipoprotéines plus légères en échange de triglycérides (Figure 7) à travers une réaction d'échange catalysée par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP). La CETP conduit à rediriger les esters de cholestérol initialement générés par la LCAT au sein des HDL vers les lipoprotéines contenant l'apoB (principalement VLDL). Au sein de la fraction HDL plasmatique, la CETP contribue en outre au remplacement de composés non hydrolysables (les esters de cholestérol) par des composés hydrolysables par la lipase hépatique (les triglycérides). Ainsi, le remplacement des esters de cholestérol des HDL par des triglycérides provenant essentiellement des VLDL, combiné à l'hydrolyse des triglycérides par la HL, conduit progressivement à l'appauvrissement des HDL en lipides neutres au niveau de son cœur. La HL joue, à ce stade, un rôle clé et des variations de l'activité HL chez l'homme ou chez la souris génétiquement modifiée

conduisent à des modifications des taux circulants de HDL (62). Une nouvelle protéine est venue récemment compléter la famille des lipases encrées à l'endothélium vasculaire : la lipase endothéliale (EL) (62). Produite par les cellules endothéliales, cette lipase contribue principalement à l'hydrolyse des phospholipides des HDL (62). Suite à l'hydrolyse des composés lipidiques des HDL, et notamment des triglycérides du cœur par la HL, il apparaît une certaine instabilité de la particule α HDL initiale qui va permettre l'émergence concomitante et spontanée de deux nouvelles particules : une particule α HDL de petite taille, pauvre en lipides neutres, et une particule pré β HDL, fruit de la redondance et de la dissociation des composés de surface. En termes de pathologies cardiovasculaires, les propriétés pro- ou anti-athérogènes de la CETP font l'objet d'un large débat depuis de nombreuses années (63). Pour certains auteurs, la CETP semble constituer un facteur pro-athérogène qui conduit à surcharger les lipoprotéines athérogènes, notamment VLDL, en cholestérol aux dépens des particules HDL anti-athérogènes. Cette action, véritable court-circuit du transport reverse du cholestérol, conduit en outre à l'accumulation dans le plasma de particules α HDL et LDL de petites tailles qui constituent les nouveaux marqueurs du risque cardiovasculaire. Cependant, pour d'autres auteurs et selon un point de vue diamétralement opposé, la CETP constituerait plutôt un facteur anti-athérogène, d'une part en contribuant à la régénération de particules pré β HDL, accepteurs initiaux du cholestérol excédentaire des tissus périphériques, et d'autre part en offrant une voie alternative au retour du cholestérol au foie par le biais des lipoprotéines à apoB et de leurs récepteurs cellulaires spécifiques. En fait, il est probable qu'*in vivo*, et notamment chez l'homme, la CETP puisse présenter les deux visages, sa pro- ou anti-athérogénicité étant en fait largement définie par un contexte métabolique précis à un instant donné (niveau d'expression de la CETP, cinétique du métabolisme des lipoprotéines, profil normo- ou dyslipidémique, situation de jeune ou période postprandiale...) (63–65).

Dans le compartiment intravasculaire, les particules HDL peuvent également connaître une étape supplémentaire de maturation sous l'influence de la PLTP (Figure 7). A partir de deux particules α HDL3, de taille et de densité intermédiaires, et grâce à un processus fusionnel, la PLTP permet l'émergence simultanée de particules α HDL2 de grande taille et de particules pré β HDL (66). En première analyse, cette propriété de la PLTP lui a valu d'être considérée plutôt comme une protéine bénéfique. En fait, la vision de la fonction principale de la PLTP mérite d'être réévaluée au regard des données les plus récentes qui ont notamment montrées l'absence de modifications significatives de la structure et de la composition des

HDL chez les souris hétérozygotes PLTP-knocked out en dépit d'une diminution d'environ 50% de l'activité plasmatique de transfert des phospholipides chez ces animaux. Ainsi, la raison d'être et la signification physiologique de la PLTP se situerait ailleurs et pourraient par exemple être davantage liées à la synthèse et à la sécrétion des lipoprotéines contenant l'apoB (11) ou au métabolisme de la vitamine E (67), un des principaux antioxydants lipophiles présents dans les lipoprotéines circulantes.

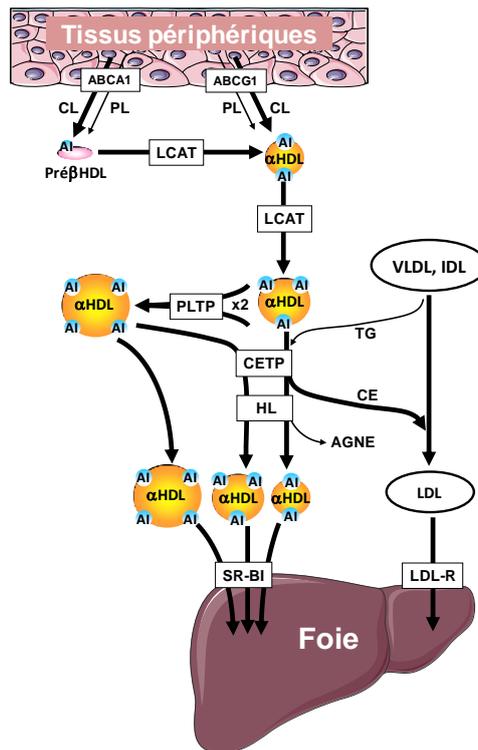


Figure 7. Métabolisme des HDL et transport reverse du cholestérol.

Les préβHDL discoïdaux constituent les accepteurs initiaux du cholestérol issu des cellules périphériques sous l'action du transporteur ABCA1. La LCAT permet ensuite l'estérification du cholestérol pour former des αHDL sphériques, dotées d'un cœur riche en esters de cholestérol, et pouvant encore accepter du cholestérol libre des tissus périphériques grâce au transporteur ABCG1. Le cholestérol peut ensuite être ramené au foie, soit directement via les HDL qui interagissent avec les récepteurs SR-BI, soit indirectement après transfert par la CETP des esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines à apoB qui ont la possibilité d'être captées par le foie via les LDL-R. Au cours de leur transit intravasculaire, les HDL subissent un remodelage constant permettant la régénération de particules préβHDL sous l'action de la CETP et de la lipase hépatique, de la PLTP et du récepteur SR-BI hépatique.

4-5 Clairance des HDL et élimination du cholestérol

Enfin, la captation des esters de cholestérol des HDL par le foie constitue l'étape finale, limitante et essentielle de la voie de transport inverse du cholestérol. La mise en évidence relativement récente de l'implication du récepteur SR-BI dans la liaison des HDL et la captation sélective des esters de cholestérol ont constitué une des découvertes majeures de la recherche dans ce domaine (41) (Tableau 5). La captation sélective désigne un processus par

lequel les esters de cholestérol des HDL peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule sans endocytose et dégradation de la particule lipoprotéique. Le récepteur SR-BI ouvre la principale voie par laquelle les esters de cholestérol des HDL peuvent être délivrés au foie et aux tissus stéroïdogènes (42). Le processus de captation sélective des esters de cholestérol requiert la liaison directe des HDL au récepteur SR-BI (Figure 8), probablement par l'intermédiaire d'interactions de type protéine-protéine, impliquant probablement des hélices amphipathiques d'apolipoprotéines. Cette première étape serait suivie de la formation d'un canal hydrophobe le long duquel les molécules d'esters de cholestérol pourraient diffuser des HDL vers la membrane plasmique le long d'un gradient de concentration (42). En fait, ces phénomènes complexes pourraient intervenir préférentiellement au niveau de régions spécialisées de la membrane plasmique : les cavéoles. La captation sélective des esters de cholestérol des HDL semble constituer une propriété propre au récepteur SR-BI, le récepteur CD36 apparenté étant dans cet exercice relativement inefficace, en dépit de sa liaison de haute affinité avec les HDL (68).

Une autre voie hépatique de captation des HDL a été décrite. Elle fait intervenir le récepteur *membrane-associated echo-F1-ATPase*, qui présente une haute affinité pour l'apoA1 et est impliqué dans la captation des protéines et des lipides des particules HDL par un mécanisme d'endocytose d'holoparticule de HDL (69).

L'apoA1 se lie à *l'écho-F1-ATPase* à la surface cellulaire des hépatocytes, ce qui entraîne l'hydrolyse d'ATP en ADP qui permet l'activation d'un récepteur couplé à la protéine G, le récepteur P2Y13. L'activation de P2Y13-R entraîne l'activation de la voie de signalisation Rho/ROCK1 et la réorganisation cytosquelettique de l'actine qui peut stimuler l'endocytose des holoparticules HDL par un récepteur de faible affinité inconnu, différent de SR-BI (69–71).

L'importance physiologique de P2Y13-R *in vivo* a été mise en évidence récemment en montrant que le transport reverse du cholestérol était altéré chez des souris déficientes en P2Y13-R (72,73). A l'inverse, l'activation *in vivo* de P2Y13-R par une injection de son agoniste partiel Cangrelor (AR-C69931MX) augmente la sécrétion biliaire de lipides chez les souris témoins mais pas chez les souris déficientes en P2Y13-R (72). De manière similaire, l'activation pharmacologique chronique de P2Y13-R par le Cangrelor chez la souris augmente la captation hépatique de HDL et la sécrétion d'acides biliaires (74).

Une étude récente a montré que le système ubiquitine-protéasome jouait un rôle dans la régulation de l'expression de P2Y13 (75). Une corrélation inverse entre l'expression cellulaire de surface de P2Y13-R et le niveau d'ubiquitination de P2Y13-R dans le réticulum

endoplasmique a été mise en évidence. L'inhibition du protéasome entraînait une augmentation de l'expression à la membrane plasmique de P2Y13-R et stimulait l'endocytose des HDL liées au P2Y13-R. L'inhibition du protéasome potentialisait fortement la captation des HDL (>200%) chez les souris témoins mais pas chez les souris déficientes en P2Y13-R.

La sécrétion biliaire constitue finalement la principale voie d'excrétion du cholestérol de l'organisme et il a été considéré pendant de nombreuses années que les VLDL, LDL ou HDL peuvent indifféremment contribuer à l'élimination biliaire du cholestérol et de ses dérivés. Cependant, il apparaît aujourd'hui clairement que plusieurs mécanismes moléculaires participent à l'élaboration de la bile et les contributions relatives des VLDL, LDL et HDL à ce processus ne sont pas équivalentes. Ce dernier soutient un concept relativement nouveau et fondamental : la nature des particules lipoprotéiques détermine le devenir métabolique du cholestérol qu'elles contiennent. Ainsi, le cholestérol des HDL rentrant dans l'hépatocyte est métabolisé par une voie extralysosomale, il est dirigé directement vers les canalicules biliaires et il constitue ainsi la principale source du cholestérol biliaire (Figure 8). En revanche, le cholestérol qui est utilisé pour la synthèse des acides biliaires provient principalement de l'internalisation des particules VLDL et LDL et de leur dégradation intralysosomale. Dans ce dernier cas et contrairement au cholestérol des HDL, le cholestérol des VLDL et LDL peut en outre être stocké et potentiellement remis en circulation (76–78).

Cependant, une élimination fécale du cholestérol utilisant une voie non biliaire a été mise en évidence chez l'animal puis chez l'homme présentant une altération de la sécrétion biliaire (79). Par la suite, il a été observé un taux d'excrétion fécale du cholestérol normal chez des souris déficientes en *canalicular phospholipid transport multidrug resistance 2* (80). Une excrétion biliaire du cholestérol normale ou diminuée associée à une augmentation des pertes fécales en stérol ont également été observés chez des souris présentant une absence d'estérification hépatique du cholestérol par l'ACAT-2 (81). C'est ainsi que l'excrétion transintestinale du cholestérol (TICE) est considérée aujourd'hui comme une voie alternative à l'élimination hépatobiliaire du cholestérol (82).

Une étude a montré, chez la souris, que le TICE représenterait 33% des pertes fécales en stérol (83). Il a également été démontré que le TICE jouait un rôle essentiel dans le transport reverse du cholestérol des macrophages, suggérant un rôle potentiellement anti-athérogène du TICE. L'excrétion intestinale du cholestérol peut être activée par un régime riche en graisses (84), des stérols végétaux (85), l'activation du ligand LXR (83) ou un ligand des PPAR δ (86).

Une étude a également mis en évidence une augmentation du TICE chez des souris déficientes en SR-BI (87).

Alors qu'il a été démontré que les transporteurs ABCG5/G8 jouaient un rôle important dans l'efflux de cholestérol au pôle apical de l'entérocyte (88), une étude a mis en évidence une diminution de seulement 40 % du TICE chez des souris déficientes en ABCG5 ou ABCG8 (83), suggérant que d'autres transporteurs sont impliqués dans le TICE. Il a ainsi été mis en évidence que le transporteur ABCB1 contribuait à l'efflux de cholestérol vers la lumière intestinale (89).

Une étude a montré que les lipoprotéines riches en apoB apparaissaient comme les pourvoyeurs préférentiels de cholestérol du TICE (90). Cependant, il a également été montré que le LDL et le HDL étaient pourvoyeurs de cholestérol pour le TICE *in vivo* et *ex vivo* chez la souris, mais également dans des explants intestinaux humains (89). Dans la même étude, il a été démontré que le TICE des LDL pouvait être modulé positivement par les statines et négativement par PCSK9, ce qui suggère un rôle du LDL-R. Cela d'autant plus que PCSK9 n'a aucun effet sur le TICE chez les souris déficientes en LDL-R. Cependant, les souris déficientes en LDL-R présentent un TICE de cholestérol des LDL, ce qui montre qu'une autre voie d'entrée entérocytaire existe.

Enfin, il semble que le rein peut également significativement contribuer au catabolisme de ces particules. Dans ce dernier cas, le mécanisme mis en jeu n'est pas la captation sélective SR-BI dépendante, des esters de cholestérol. Il implique au contraire l'endocytose récepteur-dépendante de la particule HDL toute entière. Le récepteur de haute affinité mis en jeu est la cubiline, récepteur qui est par ailleurs impliqué dans l'endocytose de la vitamine B12. La cubiline et la mégaline sont coexprimées et leurs expressions sont coréglées, indiquant que ces deux protéines peuvent coopérer dans la reconnaissance et la captation cellulaire des HDL (91).

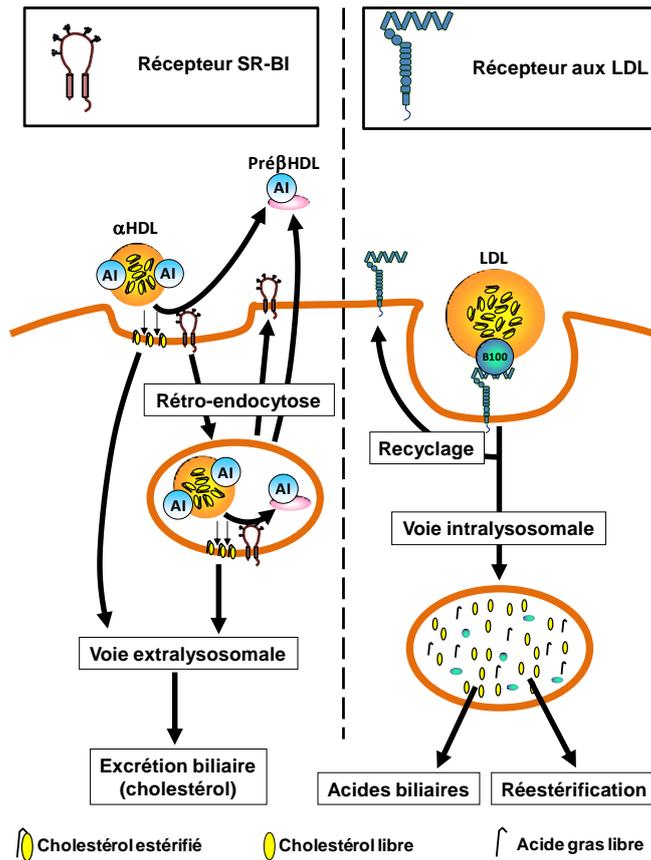


Figure 8. Métabolisme hépatique du cholestérol.

Selon la voie principale du transport reverse, le cholestérol d'origine périphérique peut être ramené au foie soit directement par les α HDL, soit indirectement après transfert sur les VLDL/IDL sous l'action de la CETP selon la voie alternative. Au niveau du foie, les α HDL sont reconnues par le récepteur SR-BI qui permet la captation sélective des esters de cholestérol, qui entrent alors dans une voie extralysosomale pour être essentiellement éliminés par voie biliaire. L'interaction des α HDL avec le récepteur SR-BI permet en outre de régénérer les particules pré β HDL qui peuvent à nouveau stimuler la voie du transport reverse du cholestérol. Les LDL sont quant à elles reconnues par leur récepteur cellulaire spécifique, qui conduit à l'endocytose de la particule et à l'hydrolyse intralysosomale de ses constituants. Le cholestérol ainsi libéré peut être soit utilisé pour la synthèse d'acides biliaires soit réestérifié pour être stocké ou réincorporé dans les VLDL.

5- CETP

5-1 Structure et fonction

Comme nous l'avons vu précédemment, la CETP intervient dans le transfert des lipides neutres (esters de cholestérol et triglycérides) entre les HDL d'une part et les lipoprotéines contenant l'apoB d'autre part. Son rôle dans le remodelage des HDL est détaillé dans le chapitre précédent.

La CETP est une glycoprotéine hydrophobe de 476 acides aminés (environ 53 kDa avant les modifications post-translationnelles). Elle est codée par un gène de 25 Kpb contenant 16 exons (35-250 pb) situé sur le bras long du chromosome 16 (16q 13) à proximité du gène de la LCAT et de l'haptoglobine (92). Son gène a une homologie réduite avec les gènes des apolipoprotéines et des enzymes intervenant dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines. En revanche, il partage 20 % d'homologie avec celui de la PLTP.

Une étude récente a apporté des informations fondamentales sur la mécanique de transfert des esters de cholestérol entre les lipoprotéines (93). La CETP a une forme courbée, asymétrique qui peut être comparée à une banane. Elle présente une extrémité N-terminale effilée et une extrémité C-terminale globuleuse. Ces deux domaines ont une forme de tonneau (Figure 9). Elle présente également une partie centrale en forme de feuille et une cavité centrale hydrophobe. La cavité qui peut accueillir deux molécules d'esters de cholestérol communique avec 2 pores situés près du domaine en central. Les auteurs de cette étude, propose un mécanisme de transfert des esters de cholestérol et des triglycérides (Figure 10), grâce aux données d'une méthode d'imagerie appelée image single-particule processing. Ainsi, la CETP forme un complexe ternaire avec une particule HDL d'une part et une particule VLDL ou LDL d'autre part. La CETP est liée à la particule HDL par son domaine N-terminal et à la particule LDL ou VLDL par son domaine C-terminal. Les régions d'interaction CETP-lipoprotéine forment des pores qui communiquent avec la cavité centrale hydrophobe. L'ensemble forme un tunnel qui permet le transfert des lipides neutres des lipoprotéines donneuses vers les lipoprotéines acceptrices.

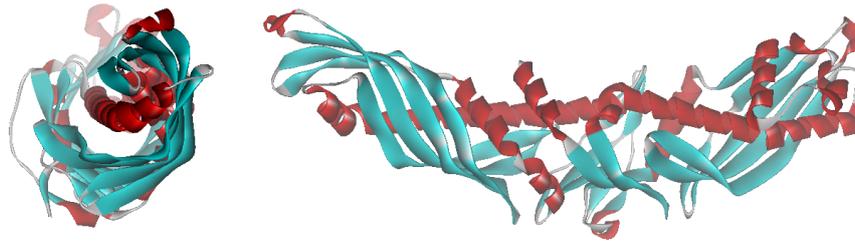


Figure 9. Structure de la CETP

A gauche, vue transversale, qui met évidence la forme de tonneaux des deux domaines N- et C- terminaux.

A droite, la forme de banane de la CETP avec son extrémité N-terminale plus effilée à gauche et son extrémité C-terminale plus globuleuse à droite.

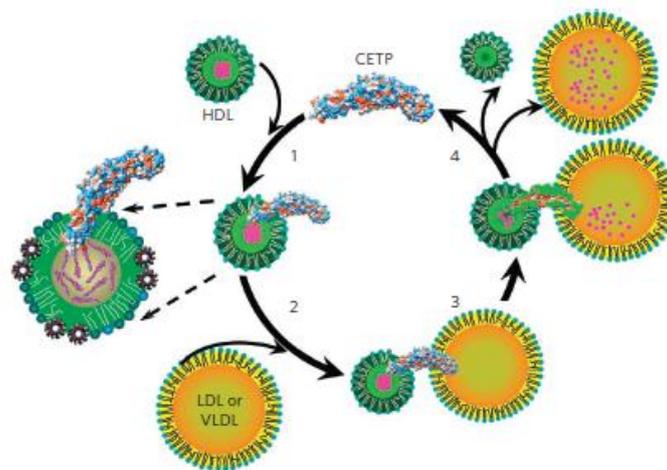


Figure 10. Mécanisme proposé du transfert d'esters de cholestérol par la CETP (selon Zhang et al (93))

Le domaine N-terminal de la CETP pénètre initialement la particule HDL et l'extrémité distale du domaine interagit avec le cœur riche en esters de cholestérol de la particule HDL (1). Dès que le domaine C-terminal de la CETP interagit avec une particule LDL ou VLDL (2), les forces moléculaires introduites par les lipoprotéines aux deux extrémités de la CETP entraînent la torsion des domaines et la formation de pores aux extrémités distales des domaines N- et C-terminaux. Ces pores se connectent avec la cavité centrale hydrophobe pour former un tunnel (3) qui permet le transfert des esters de cholestérol vers les LDL ou VLDL et entraîne une diminution de la taille des HDL (4).

5-2 Inhibition de la CETP

L'impact de la CETP sur le métabolisme du HDL a été mis en évidence initialement dans des études génétiques au sein de familles japonaises dans lesquelles les sujets qui avaient un taux plasmatique de HDL-C élevé présentaient une mutation responsable d'un déficit en CETP (94–96).

5-2-1 CETP et athérosclérose

Des études ont évalué le lien entre CETP et athérosclérose chez l'animal. La CETP existe dans le plasma d'un petit nombre d'espèces, dont l'homme et le rat (97).

La souris, dépourvue de CETP, présente une résistance au développement de l'athérosclérose. Les résultats d'études menées chez des souris transgéniques exprimant la CETP sont conflictuels et dépendant du modèle animal. Certaines études suggèrent que la CETP est proathérogène (98–100) alors que pour d'autres elle est antiathérogène (61,101,102).

Au contraire de la souris, les rats ont une activité CETP élevée (97) et sont très sensibles au développement de l'athérosclérose induite par le régime alimentaire. L'inhibition de la CETP par des oligonucléotides antisens (103), un vaccin anti-CETP (104) et des inhibiteurs pharmacologiques de la CETP (105,106) diminue fortement leur susceptibilité à l'athérosclérose.

Chez l'homme, le lien entre CETP et athérosclérose est plus confus. Certaines études évaluant le lien entre des polymorphismes du gène de la CETP et les maladies cardio-vasculaires ont conclues à un effet proathérogène de la CETP pendant que d'autres présentaient la CETP comme antiathérogène. Une étude prospective sur 7 ans, la Honolulu Heart Study, n'a ainsi pas trouvé de relation entre les mutations hétérozygotes de la CETP et les maladies cardio-vasculaires (107).

Cependant, une méta-analyse regroupant 92 études et 113833 sujets a objectivé que les polymorphismes de la CETP associés à une diminution de l'activité et de la masse CETP présentaient une élévation de leur taux de HDL-C et une diminution du risque d'événements cardio-vasculaires (108). L'analyse d'une cohorte de 18 245 femmes américaines saines issue de la Women's Genome Health Study a mis en évidence les mêmes observations (109). Une étude plus récente a montré qu'un variant du gène de la CETP était associé à une diminution du risque d'infarctus du myocarde (110). Cependant, ce variant apparemment protecteur était associé à la fois à un taux de HDL-C plus élevé mais aussi à un taux de LDL-C plus bas, ne permettant pas de distinguer quel facteur avait un rôle cardio-vasculaire protecteur prédominant.

L'ensemble de ces données animales et humaines ont conduit au développement de stratégies d'inhibition de la CETP chez l'homme pour évaluer leur potentiel antiathérogène et leur capacité à diminuer les événements cardio-vasculaires.

5-2-2 Inhibiteurs pharmacologiques de la CETP

Torcetrapib

Le torcetrapib, petite molécule inhibitrice de la CETP, agit en augmentant l'affinité de la CETP pour les particules HDL (111). Cela génère un complexe qui diminue la quantité de CETP disponible pour permettre le transfert des esters de cholestérol et de TG entre les différentes particules lipoprotéiques. Au cours de l'étude ILLUMINATE (112), 15067 patients à haut risque cardio-vasculaire ont reçu soit un traitement par atorvastatine seule soit par atorvastatine plus torcetrapib. Après 12 mois de traitement, les patients recevant le torcetrapib, présentaient une augmentation de 72.1% de leur taux de HDL-C, de 25 % de leur taux d'apoA1 et une diminution de 24.9% de leur taux de LDL-C en comparaison au début de l'étude. Il existait également une augmentation de 5.4 mmHg de la pression artérielle systolique. Cependant, il existait une augmentation significative du risque d'événements cardio-vasculaires (HR=1.25, $p<0.001$) et de mortalité toute cause (HR=1.58, $p=0.006$) chez les patients traités par torcetrapib en comparaison à ceux traités par statine seule. Une des explications apportée devant ce résultat négatif est un effet hors cible du torcetrapib (non lié à l'inhibition de la CETP) qui entrainerait une élévation des taux d'aldostérone, responsable d'une élévation de la pression artérielle et donc de la morbidité cardio-vasculaire (113). Cette hypothèse est supportée par le fait qu'une mortalité cardio-vasculaire plus élevée est observée chez les patients ayant une diminution du taux sérique de potassium et une augmentation du taux sérique de bicarbonates supérieure à la médiane. Une étude a également montré que le torcetrapib augmentait la pression artérielle chez des animaux dépourvus de CETP (114). Dans des cultures de cellules surrénaliennes corticales, le torcetrapib augmente la synthèse d'aldostérone et de cortisol (115,116). De plus certains composants du torcetrapib dénués de capacité inhibitrice de la CETP entraînent une synthèse d'aldostérone par les cellules surrénaliennes corticales (115). Enfin, le trocetrapib semble altérer la fonction endothéliale par un processus indépendant de l'inhibition de la CETP et des modifications des taux de HDL-C (117,118).

L'évaluation de l'athérome, soit par mesure de l'athérome coronarien par échographie intravasculaire (119), soit par mesure de l'épaisseur intima média (échographie transcutanée) (120,121) n'a pas démontré d'impact négatif ou positif du torcetrapib sur son développement.

Dalcetrapib

Le dalcetrapib est la première molécule inhibitrice de la CETP décrite. Son mécanisme d'action précis reste incertain, mais il semble qu'il entrainerait des modifications conformationnelles de la CETP qui diminuerait sa capacité de transfert. Une étude évaluant la plaque d'athérome n'a pas retrouvé de bénéfice significatif de la prise de dalcetrapib (122). Au cours de l'étude dal-OUTCOME (123), 15871 patients ayant présentés un syndrome coronarien aigu ont reçu quotidiennement soit 600 mg de dalcetrapib, soit un placebo en plus du traitement usuel de cette pathologie. Ils ont été suivis pendant 31 mois. Le taux plasmatique de HDL-C était significativement plus augmenté dans le groupe dalcetrapib (31 à 40%) que dans le groupe placebo (4 à 11%) par rapport au début de l'étude. Le dalcetrapib n'avait pas d'effet significatif sur le taux de LDL-C. Mais le traitement par dalcetrapib n'a eu aucun effet sur la survenue d'événements cardio-vasculaires et sur la mortalité globale. Aucun effet indésirable n'a pu être observé avec le dalcetrapib, contrairement au torcetrapib. Il n'y a, à ce jour, pas d'explication précise à cette absence d'effet du dalcetrapib. Les hypothèses émises sont une absence d'amélioration des fonctions protectrices des HDL lors de l'augmentation des taux de HDL-C ou le fait que la relation inverse entre le taux de HDL-C et le risque cardio-vasculaire observé dans les études de population est un épiphénomène qui ne reflète pas la capacité des HDL à protéger contre les maladies cardio-vasculaires. La faible augmentation des taux de HDL-C en comparaison au torcetrapib est également mise en cause. Au vu des résultats de l'étude de Voight, au cours de laquelle les sujets porteurs d'un variant du gène de la CETP associé à une diminution du risque cardio-vasculaire présentent à la fois une augmentation de la concentration en HDL-C et une diminution de celle en LDL-C (110), Barter (124) suppose qu'il est possible qu'il faille que l'inhibiteur de la CETP augmente le taux de HDL-C et diminue le taux de LDL-C.

Les inhibiteurs de la CETP, anacetrapib et evacetrapib, actuellement en cours d'évaluation, entraînent une élévation notable du taux de HDL-C ainsi qu'une diminution du taux de LDL-C et semblent dénuer d'effets indésirables.

Anacetrapib

Chez l'homme, à la dose de 100 mg par jour (Etude DEFINE menée chez 1623 patients pendant 18 mois), l'anacetrapib entraîne un doublement du taux de HDL-C et une diminution de 40% du taux de LDL-C (125). Au cours de cette étude, il n'a pas été mis en évidence d'effet de l'anacetrapib sur la pression artérielle, le taux d'aldostérone et les électrolytes. De plus, il ne stimule pas la synthèse d'aldostérone dans des cultures de cellules surrénaliennes corticales (114). Dans des modèles animaux, l'anacetrapib améliore le transport reverse du cholestérol des macrophages (126).

Une étude de phase 3 (REVEAL) évaluant l'impact de l'anacetrapib sur la survenue d'événements cardio-vasculaires est en cours.

Evacetrapib

L'evacetrapib n'entraîne pas d'élévation de la pression artérielle chez le rat contrairement au torcetrapib et il n'induit pas de synthèse de cortisol ou d'aldostérone dans des cultures de cellules surrénaliennes (127). Dans une étude menée chez 398 patients, l'evacetrapib entraîne une élévation dose dépendante du taux de HDL-C (54 à 129%) et une diminution du taux de LDL-C (14 à 36%) au cours des 12 semaines de traitement, en monothérapie. Les modifications sont tout aussi significatives lorsqu'il est donné en plus d'une statine (128).

5-2-3 Autres inhibiteurs de la CETP

Une étude très récente a évalué dans un modèle de souris transgéniques l'impact d'un oligonucléotide antisens inhibiteur de la CETP en comparaison à l'anacetrapib (129). Il a été démontré que l'augmentation du taux de HDL-C et la diminution de l'activité CETP était comparable dans les 2 groupes. En revanche, seules les souris traitées avec l'oligonucléotide antisens présentaient un effet de stimulation du transport reverse du cholestérol des macrophages, qui pourrait être dû à des différences dans la composition des HDL. En outre, la diminution de l'ARNm de la CETP liée à l'oligonucléotide antisens était associée à une diminution de l'accumulation de cholestérol dans la paroi artérielle. Ces données préliminaires constituent une autre piste de développement d'inhibiteur de la CETP.

5-2-4 Controverses concernant l'inhibition de la CETP

L'utilisation d'inhibiteurs de la CETP pour réduire le risque cardio-vasculaire est sujette à controverse.

La première controverse, la principale, est celle du rôle pro- ou antiathérogène des inhibiteurs de la CETP. D'un point de vue antiathérogène, la CETP facilite le retour indirect du cholestérol vers le foie par l'intermédiaire du LDL-R et elle intervient dans la formation des particules préβHDL. Ces particules pauvres en lipides permettent le transfert cellulaire initial du cholestérol depuis les macrophages (130,131).

D'un point de vue proathérogène, il a été démontré que les patients avec des désordres métaboliques (hypertriglycémie, hypercholestérolémie avec ou sans hypertriglycémie, diabète et obésité) présentent une augmentation du transfert des esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines riches en apoB ce qui contribue de manière significative à la progression de l'athérosclérose et à l'augmentation du risque cardiovasculaire (132). De plus, la CETP joue un rôle déterminant dans la formation des particules LDL athérogènes, petites et denses enrichies en esters de cholestérol, soit directement en favorisant le transfert des esters de cholestérol des HDL vers les LDL petites et denses, soit indirectement en enrichissant de manière préférentielle en esters de cholestérol les particules larges de VLDL, précurseurs des LDL petites et denses (133).

Dans les états dyslipidémiques majeurs associés à une athérosclérose précoce et caractérisés par un taux de HDL-C bas, un transfert accéléré des esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines contenant de l'apoB et médié par la CETP est observé. Ces observations soutiennent l'idée qu'une réduction de l'activité CETP chez les sujets avec des anomalies métaboliques peut avoir un effet anti-athérogène. Cependant, malgré un impact favorable évident sur le profil lipidique avec une nette augmentation des taux de HDL-C et une diminution spécifique des particules denses de LDL (134), les thérapeutiques inhibitrices de la CETP échouent à démontrer jusqu'ici une efficacité significative à réduire la progression de l'athérosclérose et la survenue des événements cardiovasculaires.

Cela suggère qu'une activité CETP résiduelle devrait être maintenue pour préserver les propriétés anti-athérogènes associées à l'action physiologique de la CETP (131). Villard et al (135) propose ainsi une fourchette d'activité CETP optimale située entre 22 et 34% représentant la future cible thérapeutique pour l'activité CETP endogène chez les patients avec des anomalies métaboliques et à haut risque cardio-vasculaire.

Quoiqu'il en soit, le résultat des essais cliniques en cours aura un rôle important pour répondre à cette question.

Le second point concerne l'effet de l'inhibition de la CETP sur la fonction des HDL. Certains suggèrent que l'inhibition de la CETP générerait des particules HDL dysfonctionnelles. Cependant, il a été montré que des HDL isolées de patients traités par anacetrapid avaient une capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol des macrophages améliorée (136). Des études supplémentaires sont nécessaires pour répondre à cette question.

6- HDL et risque cardiovasculaire

Il existe une association inverse entre le taux plasmatique de HDL-C et les événements coronariens dans les études observationnelles (137,138). Cette association persiste dans la plupart des analyses post hoc et des méta-analyses d'études thérapeutiques évaluant les statines réalisées chez des patients avec des facteurs de risque cardio-vasculaires, des pathologies cardio-vasculaires chroniques ou un syndrome coronarien aigu récent (139–145).

Les études observationnelles ne permettent pas d'établir un lien de causalité entre le taux de HDL-C et la survenue des maladies cardio-vasculaires. Les études pharmacologiques randomisées de grande ampleur ainsi que les études d'anomalies génétiques mendéliennes permettent d'apporter des arguments pour un lien de causalité.

Ainsi, les études d'observations mettent en évidence une association positive entre le taux de LDL-C et le risque cardio-vasculaire. Les résultats des essais cliniques avec des traitements diminuant le taux de LDL-C et les études faites au cours des maladies génétiques (141,146,147) sont concordantes et suggèrent que l'élévation du taux plasmatique de LDL-C est en cause dans l'augmentation du risque d'IDM.

Pour le HDL-C, les études génétiques et pharmacologiques échouent à mettre en évidence un lien de causalité entre le taux de HDL-C et le risque cardio-vasculaire.

Sur le plan génétique, une première étude n'a pas retrouvé de lien entre un taux plasmatique de HDL-C bas dû à une mutation perte de fonction de ABCA1 et une élévation du risque de coronaropathie (148).

En partant du principe que les génotypes sont attribués au hasard lors de la méiose, sont indépendants de facteurs confondants non génétiques et ne sont pas modifiés par un processus pathologique, la randomisation mendélienne a été utilisée pour étudier l'hypothèse d'une

association causale entre le taux plasmatique de HDL-C et risque d'IDM. 2 types d'analyses de randomisation mendéliennes ont été réalisés par Voight et al (110). Il n'a pas été retrouvé de lien entre les SNP connus pour augmenter le taux de HDL-C et la diminution du risque d'IDM.

Les études thérapeutiques d'intervention ne démontrent pas non plus de bénéfice cardiovasculaire à l'augmentation pharmacologique du HDL-C. Ainsi, au cours de l'étude ILLUMINATE, le traitement par torcetrapib, un inhibiteur de la CETP, s'est accompagné d'une augmentation de la mortalité et des événements cardio-vasculaires, qui a conduit à un arrêt prématuré de l'étude (112). Le résultat était similaire au cours de l'étude dal-OUTCOME qui n'a pas retrouvé de bénéfice en termes d'événements cardio-vasculaires chez des patients victimes d'un syndrome coronarien aigu et traités par dalcetrapib, un inhibiteur de CETP (123). L'étude AIM-HIGH a évalué l'impact d'un traitement par niacine en termes d'événements cardio-vasculaires chez des patients présentant un taux de HDL-C bas et déjà traités par statines (AIM-HIGH investigators, NEJM 2011). Alors que le taux de HDL-C a augmenté de manière significative (de 0,35 à 0,42 g/l) chez les patients ayant reçus de la niacine, il n'y pas eu d'effet sur le nombre d'événements cardio-vasculaires.

Alors qu'il existe un risque cardio-vasculaires résiduel malgré la baisse importante du taux de LDL-C, il n'existe à ce jour pas de preuve que l'élévation du taux de HDL-C permette d'améliorer le risque cardio-vasculaire alors qu'un taux de HDL-C bas est considéré comme un facteur de risque cardio-vasculaire. Dans ce contexte, le résultat des études en cours concernant les inhibiteurs de la CETP est attendu avec un intérêt tout particulier.

II- Particularités du métabolisme des lipoprotéines au cours du diabète

1- Influence de l'insuline sur le métabolisme des lipoprotéines

L'insuline joue un rôle central dans la régulation du métabolisme lipidique (149).

Dans le tissu adipeux, l'insuline inhibe la lipase hormono-sensible. Ainsi, l'insuline a une action anti-lipolytique, favorise le stockage des triglycérides dans les adipocytes et diminue la libération d'acides gras libres du tissu adipeux vers la circulation.

L'insuline inhibe la production de VLDL par le foie. Chez le sujet sain, il a été démontré que l'insuline entraînait une diminution de 67% de la production de VLDL-triglycérides et une diminution de 52% de la production de VLDL-apoB (150,151). L'insuline diminue la production de VLDL en diminuant les acides gras libres circulants (par son action antilipolytique), qui sont les substrats des VLDL, mais aussi par un effet inhibiteur direct sur l'hépatocyte (151,152). L'insuline est un activateur puissant de la lipoprotéine lipase, qui favorise le catabolisme des lipoprotéines riches en TG et diminue par conséquent, le taux plasmatique de TG. L'insuline n'a pas qu'un effet de stimulation de l'activité de la LPL (153), mais elle a aussi un effet direct sur le gène de la LPL, en stimulant la synthèse de LPL (154). L'insuline stimule la clairance des LDL, en augmentant l'expression et l'activité du récepteur au LDL B/E (155,156).

L'insuline agit également sur le métabolisme des HDL en augmentant l'activité de la LCAT et de la lipase hépatique (157).

2- Anomalies lipidiques au cours du diabète de type 1

2-1 Anomalies lipidiques quantitatives

Les anomalies lipidiques quantitatives rencontrées au cours du diabète de type 1 sont différentes selon que le diabète soit traité ou non par insuline et lorsqu'il est traité, selon qu'il soit bien équilibré ou non.

Au cours du diabète de type 1 non traité

Les patients diabétiques de type 1, non traités et donc en acidocétose diabétique, présentent des anomalies lipidiques quantitatives, liées au déficit en insuline. Les lipoprotéines riches en TG (chylomicrons et VLDL) sont augmentées ce qui entraîne une hypertriglycémie. Cela est principalement dû à une diminution de l'activité de la LPL (149,158). L'acidocétose diabétique est une situation de déficit sévère en insuline avec pour conséquence une diminution de l'activité de la LPL, qui est habituellement stimulée par l'insuline. La diminution de l'activité de la LPL entraîne une réduction importante du catabolisme des lipoprotéines riches en TG (159). La diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en TG est le principal facteur impliqué dans l'hypertriglycémie observée en situation de carence en insuline. Cette hypertriglycémie est rapidement résolutive après la mise en place d'une insulinothérapie adaptée (160).

Le taux de LDL-C est diminué lors de l'acidocétose diabétique (160). Cette diminution est la conséquence directe de la diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en TG.

Le taux de HDL-C est diminué de manière significative (160). Cette réduction est la conséquence de l'hypertriglycémie observée lors de l'acidocétose diabétique. L'augmentation du taux des lipoprotéines riches en TG stimule, via la CETP, le transfert des TG des lipoprotéines riches en TG vers les HDL ce qui conduit à la formation de particules HDL riches en TG. Les HDL riches en TG deviennent un bon substrat pour la lipase hépatique, ce qui entraîne une augmentation de leur catabolisme et donc une diminution du taux plasmatique de HDL-C. Cette baisse du taux de HDL-C est rapidement résolutive après mise en place d'une insulinothérapie adaptée (160).

Au cours du diabète de type 1 traité

Les patients diabétiques de type 1 traités peuvent présenter des anomalies lipidiques quantitatives. Une étude prospective menée chez 895 jeunes patients diabétiques de type 1, montrait que 20,1% d'entre eux avaient un taux de triglycérides supérieur à 1,7 mmol/l, 9,6% avaient un taux de LDL-C supérieur à 3,4 mmol/l et 25,9% avaient un taux de non-HDL-C supérieur à 3,4 mmol/l (161). Dans cette étude, l'HbA1C était indépendamment corrélée avec le taux de LDL-C, non-HDL-C et de triglycérides, indiquant que ces anomalies sont principalement observées chez les patients avec un mauvais équilibre glycémique(161). Dans l'étude DCCT (Diabetes Control and Complications Trial), l'HbA1C était corrélée positivement avec le taux de cholestérol total, de LDL-C et de TG à l'inclusion (162). Dans une étude récente, menée chez 512 jeunes patients diabétiques de type 1 et 188 contrôles appariés sur l'âge, les patients avec un équilibre glycémique moyen (HbA1C>7,5%) avaient significativement plus d'anomalies lipidiques quantitatives que les patients avec un équilibre optimal (HbA1C<7,5%) (163).

Ces données montrent donc que les anomalies lipidiques quantitatives sont plus fréquentes lorsque le diabète de type 1 est mal contrôlé.

Au cours du diabète de type 1 traité avec un équilibre glycémique mauvais ou moyen

Les patients diabétiques de type 1 mal équilibrés peuvent présenter une élévation du taux de triglycérides (158). Cette hypertriglycémie est liée à une augmentation de la production de VLDL, favorisée par l'augmentation des acides gras circulants, secondaire au déficit relatif en insuline (164).

Une augmentation du taux de LDL-C peut également être observée chez ces patients en comparaison à des patients diabétiques de type 1 bien équilibrés (158,163). La production de VLDL est augmentée, ce qui entraîne une augmentation de la production de LDL (158).

Au cours du diabète de type 1 traité avec un équilibre glycémique optimal

Chez les patients diabétiques de type 1 bien contrôlés, le taux plasmatique de triglycérides est normal ou discrètement diminué (158,164). Cette faible diminution des triglycérides peut être observée en cas d'insulinothérapie intensive par un rétrocontrôle négatif de la production de VLDL liée à une augmentation du taux plasmatique d'insuline, conséquence de la délivrance d'insuline par voie sous cutanée (165,166). De plus, chez ces

patients bien contrôlés, il a été montré que l'hyperinsulinémie périphérique était associée à une élévation de l'activité de la LPL, qui peut être un facteur supplémentaire pour expliquer cette diminution du taux plasmatique de triglycérides (167).

Le taux de LDL-C est normal ou faiblement diminué (168). Cette diminution peut être observée lors d'une insulinothérapie intensive en conséquence de la diminution de la production de VLDL liée à l'hyperinsulinisme périphérique.

Le taux plasmatique de HDL-C est normal ou faiblement augmenté chez ces patients (158). Certaines études ont montré une élévation des fractions HDL₂ (169,170) alors que d'autres observent une augmentation des fractions HDL₃ (168). Il a également été rapporté que l'augmentation du taux de HDL-C chez ces patients diabétiques de type 1 bien contrôlés était liée à une augmentation des particules de HDL contenant uniquement l'apoA1 (170). Cette augmentation du taux de HDL-C peut être la conséquence d'une élévation du ratio LPL/Lipase hépatique (augmentation de l'activité de la LPL et activité normale de la lipase hépatique) (170). L'augmentation de l'activité de la LPL est probablement due à l'hyperinsulinisme périphérique, conséquence de l'administration sous cutanée d'insuline (170).

Au cours du diabète de type 1 traité par insulinothérapie sous cutanée versus traité par insulinothérapie intrapéritonéale

L'insulinothérapie intensive sous-cutanée permet une normalisation de la glycémie mais au détriment d'un hyperinsulinisme périphérique, qui peut modifier le métabolisme lipoprotéique comme nous l'avons vu auparavant. Les pompes à insuline implantables qui assurent une administration intrapéritonéale d'insuline miment la distribution physiologique de l'insuline et peuvent restaurer le gradient normal insuline portale/insuline périphérique.

Plusieurs études ont donc été menées pour étudier la modification du métabolisme lipoprotéique après le remplacement d'une insulinothérapie sous-cutanée par une insulinothérapie intra-péritonéale. Le taux plasmatique de triglycérides a été retrouvé augmenté dans une étude (171) et inchangé dans 3 autres études (157,172,173). Les taux de cholestérol total et d'ApoB n'étaient pas modifiés (157,171-173). Le taux de HDL-C était retrouvé diminué (171) ou non modifié (157,172,174). Les divergences entre ces études peuvent être liées à des facteurs confondants comme le niveau d'équilibre glycémique et le niveau d'insuline périphérique lors de l'insulinothérapie sous-cutanée.

Au cours du diabète de type 1 avec néphropathie

Les patients avec un diabète de type 1 compliqué d'une néphropathie avec macroalbuminurie (albuminurie supérieure à 300 mg/24h) présentent une augmentation des taux de cholestérol total, de triglycérides et de LDL-C et une diminution des taux de HDL-C liée à une diminution des HDL₂ (158,166,175). Dans l'étude EURODIAB IDDM Complications, la macroalbuminurie était associée de manière significative avec une élévation des taux de triglycérides, cholestérol total, LDL-C et du ratio LDL/HDL dans les deux sexes et avec une diminution des taux de HDL-C chez les femmes (176).

Certaines anomalies lipidiques quantitatives peuvent également être observées chez les patients diabétiques de type 1 avec une microalbuminurie. Des patients microalbuminuriques comparés à des patients normoalbuminuriques présentent une élévation de l'apoB plasmatique (177-179), du taux de LDL-C (177,178) et du ratio apoB/apoA1 (178,179). Une corrélation positive a été retrouvée entre le taux d'excrétion urinaire de l'albumine et le taux plasmatique d'apoB et le ratio apoB/apoA1 (178). Dans l'étude EURODIAB IDDM Complications, la microalbuminurie était associée avec une élévation de la triglycéridémie (176). Les mécanismes responsables de ces anomalies lipoprotéiques chez les diabétiques de type restent peu clairs.

De plus, il a été démontré que les lipides sériques étaient associés avec la progression de la néphropathie dans le diabète de type 1. Dans une étude prospective menée chez 152 patients diabétiques de type 1 suivis pendant 8 à 9 ans, le LDL-C était un facteur associé de manière indépendante avec la progression de la néphropathie (180).

2-2 Anomalies lipidiques qualitatives

Plusieurs anomalies qualitatives des lipoprotéines existent chez les patients avec un diabète de type 1 même chez ceux qui ont un bon équilibre glycémique et qui n'ont pas de modifications quantitatives significatives des lipoprotéines. Ces anomalies qualitatives ne sont pas totalement réversibles par un équilibre glycémique optimal et peuvent être athérogènes.

Anomalies qualitatives des VLDL

Les VLDL des patients diabétiques de type 1 sont fréquemment enrichies en cholestérol estérifié au détriment des triglycérides ce qui conduit à une augmentation du ratio cholestérol/TG au sein des VLDL (181,182). Il a été suggéré que ce changement de

composition pouvait être lié à une augmentation du transfert d'ester de cholestérol entre les lipoprotéines (182). Il a été démontré que le ratio cholestérol/TG au sein des VLDL était significativement diminué en cas d'insulinothérapie intrapéritonéale (183). En outre, le ratio cholestérol libre/lécithine dans la couche périphérique des particules de VLDL est augmenté (158,182). Il a été démontré que cette augmentation majore le risque d'événements cardiovasculaires probablement en diminuant la fluidité et la stabilité des lipoprotéines (184). En outre, il a été démontré que les VLDL des patients diabétiques de type 1 pouvaient induire *in vitro* une réponse anormale du métabolisme cellulaire du cholestérol dans les macrophages humains (185).

Anomalies qualitatives des LDL

Les LDL des patients diabétiques de type 1 sont souvent enrichies en triglycérides et une augmentation du nombre de LDL petites et denses est observée (186–188). La présence de LDL petites et denses est associée à une augmentation du risque cardiovasculaire (189). Des données indiquent que les LDL petites et denses ont des propriétés athérogènes. Elles ont en effet une affinité réduite pour le récepteur LDL B/E et sont préférentiellement captées par les macrophages, grâce au récepteur scavenger, entraînant la formation des cellules spumeuses. Les LDL petites et denses ont une affinité plus haute pour les protéoglycanes de l'intima que les LDL larges ce qui favorise la pénétration des LDL dans la paroi artérielle (190). Il a également été démontré que les sujets avec des particules LDL petites et denses présentaient une altération de la réponse endothéliale à la vasodilatation par l'acétylcholine (191). En outre, ces particules ont une susceptibilité accrue à l'oxydation (192). Une diminution de la proportion des LDL petites et denses a été rapportée après optimisation de l'équilibre glycémique chez des patients avec un diabète de type 1 (193).

Le ratio cholestérol libre/lécithine au sein de la couche périphérique des particules de LDL est augmenté (158,182). Chez les patients diabétiques de type 1, la glycation de l'apoB survient au sein des LDL de manière parallèle à l'hyperglycémie plasmatique. Il a été démontré que la glycation de l'apoB diminuait significativement la liaison des LDL au récepteur B/E même quand la glycation de l'apoB est modérée (194,195). De plus, les LDL glyquées sont préférentiellement captées par les macrophages grâce au récepteur scavenger, ce qui conduit à la formation de cellules spumeuses dans la paroi artérielle.

En outre, les patients diabétiques de type 1 présentent une augmentation de l'oxydation des LDL, qui est favorisée par les excursions glycémiques (196). Les modifications oxydatives des LDL entraîne une captation rapide par les macrophages, ce qui conduit à la formation de cellules spumeuses. Les LDL oxydées ont des effets chimiotactiques sur les monocytes en augmentant la synthèse de molécules d'adhésion, comme les ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire-1) par les cellules endothéliales. Les LDLs oxydées stimulent la formation par les macrophages de cytokines, comme le TNF α ou l'IL1, qui amplifient le processus inflammatoire de l'athérosclérose.

Anomalies qualitatives des HDL

Les HDL des patients diabétiques de type 1 sont souvent enrichies en triglycérides (158,182). Ces modifications ont été attribuées à une augmentation du transfert des esters de cholestérol entre les lipoprotéines (182). Au sein des HDL des patients diabétiques de type 1, le ratio sphingomyeline/lécithine dans la couche périphérique est augmenté, ce qui augmente la rigidité des HDL (197). Ces altérations ne sont pas complètement réversibles après l'obtention d'un équilibre glycémique optimal (198). Ces patients présentent une glycation de l'apoA1 au sein des HDL, ce qui altère le transport reverse du cholestérol médié par les HDL. En effet, il a été montré que les HDLs contenant de l'apoA1 glyquée étaient moins efficaces pour promouvoir l'efflux de cholestérol des cellules (199).

En plus de leur rôle dans la voie de retour du cholestérol, les HDLs ont des propriétés anti-oxydatives, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et vasorelaxantes, potentiellement anti-athérogènes (200). Certaines de ces propriétés sont diminuées chez les patients diabétiques de type 1. Une diminution de l'activité de la paraoxonase, une enzyme antioxydante lorsqu'elle est associée aux HDL a été observée chez les patients diabétiques de type 1 (201,202). En conséquence, les HDL des patients diabétiques de type 1 protègent de manière moins efficace la membrane érythrocytaire et les LDL contre le stress oxydatif que les HDL de sujets sains (201,202). De plus, en utilisant de l'aorte de lapin, il a été démontré que les HDL de sujets diabétiques de type 1 étaient moins capables de prévenir l'endothélium de la vasoconstriction induite par les LDL oxydées que les HDL de sujets sains (203).

Anomalies qualitatives des protéines de transfert des lipides

Dans certaines études une augmentation du transfert des esters de cholestérol entre les HDL et les lipoprotéines contenant de l'apoB (182,204) ou une augmentation de l'activité de la CETP ont été observés chez des patients diabétiques de type 1 normolipidémiques (205). Dans d'autres études, une augmentation de l'activité CETP n'est retrouvée que chez les patients diabétiques de type 1 fumeurs ou avec une microalbuminurie (206,207). Cette augmentation de l'activité CETP peut expliquer l'augmentation du ratio cholestérol libre/TG au sein des VLDL et sa diminution au sein des HDL. Des études ont montré une corrélation positive entre l'activité CETP et l'hyperglycémie (208,209). Cependant, le principal facteur qui pourrait expliquer l'augmentation de l'activité CETP chez les patients DT1, pourrait être l'hyperinsulinémie périphérique secondaire à l'administration sous cutanée d'insuline. En effet, il a été démontré que l'hyperinsulinémie périphérique était responsable d'une augmentation de l'activité de la LPL chez les patients DT1 (167) et il a été démontré que la LPL, en présence de VLDL, stimulait l'activité CETP (210,211). De plus, il a été montré que l'augmentation de l'activité de la LPL et de la CETP était abolie lorsque l'insuline était administrée par voie intrapéritonéale par pompe implantable ou après greffe pancréatique (204,212).

Une élévation de l'activité de la PLTP a été reporté chez des patients diabétiques de type 1 (205). Dans cette étude, l'activité de la PLTP était corrélée positivement avec l'activité CETP, le LDL-C et le HDL-C. Les causes et les conséquences de cette augmentation de l'activité PLTP restent peu claires.

En somme, il existe chez les patients diabétiques de type 1 :

- Des anomalies lipidiques quantitatives lorsque l'équilibre glycémique est insuffisant (augmentation des TG et du LDL-C) ou lorsqu'une micro- ou une macroalbuminurie est associée (élévation des TG, du LDL-C et diminution du HDL).
- Des anomalies lipidiques beaucoup plus rares lorsque l'équilibre glycémique est satisfaisant puisque le taux de triglycérides est normal ou discrètement diminué, et que les taux de LDL et de HDL sont parfois augmentés.
- Des anomalies qualitatives même si l'équilibre glycémique est bon. Ces anomalies ne sont pas complètement expliquées par l'hyperglycémie et peuvent être dues à l'hyperinsulinémie périphérique secondaire à l'administration sous cutanée de l'insuline. Les conséquences exactes de ces anomalies qualitatives sur le développement des maladies cardio-vasculaires n'est pas connu.

3- Anomalies lipidiques au cours du diabète de type 2

Les maladies cardiovasculaires sont une cause majeure de mortalité et de morbidité chez les patients diabétiques de type 2 chez qui le risque de maladie cardio-vasculaire est 2 à 4 fois supérieur à celui des sujets non diabétiques (166,213). Les anomalies lipidiques observées au cours du diabète de type 2, sont un des facteurs majeurs contribuant au risque cardio-vasculaire (214–218). Les anomalies lipidiques sont à la fois quantitatives et qualitatives. L'insulinorésistance joue un rôle clé dans la physiopathologie de ces anomalies lipidiques. D'autres facteurs, comme les adipocytokines, pourraient également être impliqués.

3-1 Anomalies lipidiques quantitatives et qualitatives

Les principales anomalies quantitatives au cours du diabète de type 2, sont l'augmentation des triglycérides plasmatiques et la diminution du HDL-C. Le taux plasmatique de LDL-C est le plus souvent normal ou légèrement augmenté.

Les anomalies qualitatives sont susceptibles de favoriser la survenue d'accidents cardio-vasculaires, en raison de leur caractère particulièrement athérogène. Parmi ces anomalies, on note principalement :

- Des VLDL de grande taille, enrichies en triglycérides (VLDL₁)
- Des LDL denses, de petites tailles, enrichies en triglycérides
- Une augmentation de l'oxydation des LDL
- Un enrichissement des HDL en triglycérides
- Une augmentation de la glycation des apolipoprotéines (en particulier A1 et B).

La fréquence des anomalies lipidiques au cours du diabète de type 2 est particulièrement élevée. En effet, les anomalies quantitatives des lipoprotéines sont retrouvées chez 65 à 80% des patients diabétiques de type 2. A titre d'exemple, plus de 66% des patients diabétiques de l'étude United Kingdom Prospective Study (UKPDS) présentaient un HDL-C diminué (218). La fréquence des anomalies qualitatives des lipoprotéines est encore plus élevée.

3-2 Mécanismes des anomalies lipidiques au cours du diabète de type 2

Au sein des lipoprotéines riches en triglycérides

L'hypertriglycémie, particulièrement fréquente chez le diabétique de type 2, est essentiellement due à une augmentation des VLDL et, à un moindre degré, des IDL (166,213,219). Soixante-dix pour cent de l'augmentation des triglycérides est liée à une augmentation du nombre de lipoprotéines riches en triglycérides (220). Par ailleurs, il est observé une augmentation de la taille des VLDL avec prédominance des sous-fractions VLDL₁, riches en triglycérides (221). Un des mécanismes en cause dans l'hypertriglycémie du diabétique de type 2 est une augmentation de la production hépatique des VLDL, et plus particulièrement des VLDL₁ (221,222). Celle-ci apparaît liée à plusieurs facteurs dont une augmentation des substrats de la biosynthèse des triglycérides (acides gras libres), à une résistance de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production et la sécrétion des VLDL et éventuellement à une augmentation de la lipogenèse de novo dans l'hépatocyte (221,223). L'effet inhibiteur direct de l'insuline sur la production des VLDL est actuellement bien documenté. Il a été démontré que l'insuline diminuait le taux de traduction de l'ARN messager de l'apoB (224). Via l'activation de la phospho-inositide-3-kinase, l'insuline inhibe la sécrétion de l'apoB et la transformation dans l'hépatocyte des pré-VLDL en VLDL (225). Par ailleurs, l'insuline réduit au sein de l'hépatocyte la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) intervenant dans l'assemblage des VLDL (226), et une augmentation de la MTP est observée chez les hamsters insulino-résistants (227,228). Ainsi l'augmentation de la production des VLDL, au cours du diabète de type 2, pourrait en partie s'expliquer par une résistance à l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique des VLDL. Ce mécanisme semble intervenir relativement précocement dans la mesure où une résistance à l'effet inhibiteur de l'insuline est déjà observé chez le patient obèse non diabétique (150). Il est aussi suggéré qu'une augmentation de la lipogenèse de novo dans l'hépatocyte puisse se produire chez les diabétiques de type 2 (221). Celle-ci serait liée à une augmentation de l'expression de la *sterol regulatory element binding protein 1c* (SREBP-1C), qui active les enzymes de la lipogenèse (229).

Associée à l'augmentation de la production hépatique de VLDL, il est observé, au cours du diabète de type 2, une diminution du catabolisme des VLDL, authentifiée in vivo par des études à l'aide de radio-isotopes (230) et d'isotopes stables (231). Cette réduction du catabolisme des VLDL est le reflet de la diminution d'activité de la lipoprotéine lipase,

laquelle a été mise en évidence dans le diabète de type 2 (232). Le ralentissement de la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides ne se limite pas seulement aux VLDL, mais est aussi observé pour les IDL (231) et les chylomicrons (233). La diminution de la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides au cours du diabète de type parait largement attribuable à la réduction d'activité de la lipoprotéine lipase, même si la modification de composition des différentes lipoprotéines, observée au cours du diabète, pourrait être également en cause dans le ralentissement du catabolisme, comme le suggèrent certains travaux chez l'animal (234).

A côté de l'hypertriglycémie à jeun, il est aussi observé, dans le diabète de type 2, une hypertriglycémie postprandiale marquée, liée à un retard d'épuration des chylomicrons et à une freination incomplète de la production des VLDL (et plus particulièrement des VLDL₁) en période postprandiale (235).

Enfin, l'hyperglycémie chronique, par le biais de la glycation des apolipoprotéines pourrait aussi intervenir dans les modifications du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. En effet, la glycation de l'apo-B apparait susceptible de réduire la liaison des lipoprotéines au récepteur B/E (166,213). La glycation de l'apoC2, cofacteur de la lipoprotéine lipase, pourrait aussi être en cause dans la réduction de son activité.

Par ailleurs, signalons que les VLDL₁, riches en triglycérides, s'accumulent préférentiellement dans les macrophages, favorisant la promotion des cellules spumeuses.

Au sein des LDL

Si le taux plasmatique de LDL-cholestérol est le plus souvent normal au cours du diabète de type 2, il est observé en revanche des modifications importantes de son métabolisme. En effet, il a été montré *in vivo*, chez les patients diabétiques de type 2 ayant un taux de LDL-C identique à celui d'une population normale, une diminution de 28% du catabolisme des LDL compensée par une réduction de leur production (231).

C'est ainsi que malgré un taux plasmatique normal, les LDL des patients diabétiques présentent un ralentissement de leur catabolisme, c'est-à-dire une augmentation de leur temps de résidence plasmatique, susceptible de les rendre plus athérogènes. Ce ralentissement du catabolisme des LDL semble en partie lié à une réduction du nombre des récepteurs LDL, comme cela a été montré *in vivo* (237). Cette diminution du nombre des récepteurs LDL apparait secondaire à la carence « relative » en insuline. En effet, l'insuline est un facteur induisant l'expression des récepteurs LDL (238) et le traitement par insuline, chez les

diabétiques de type 2, restaure un nombre normal de récepteurs LDL (237). Par ailleurs, il n'est pas exclu que les modifications qualitatives des LDL (telle que la glycation de l'apoB) puissent réduire leur affinité pour leur récepteur.

Les particules LDL du patient diabétique de type 2 présentent des anomalies qualitatives susceptibles de jouer un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. Il est retrouvé une prédominance de particules LDL de petite taille, enrichies en triglycérides (LDL de classe B) (166,213,221) dont le taux apparaît relié à l'hypertriglycéridémie et plus particulièrement à l'augmentation des VLDL₁ (221). Il est très vraisemblable que l'augmentation du pool des lipoprotéines riches en triglycérides (telles que VLDL₁), observée dans le diabète de type 2, stimule l'activité de la CETP, favorisant ainsi le transfert des triglycérides des lipoprotéines riches en triglycérides vers les LDL, donnant ainsi naissance à des LDL petites et denses enrichies en triglycérides. De nombreux travaux ont clairement montré que les LDL de petite taille étaient particulièrement athérogènes et présentaient un risque accru de survenue d'accidents coronaires (189). En effet, les LDL petites et denses s'accumulent préférentiellement dans les macrophages, favorisant la promotion de cellules spumeuses, et présentent une oxydabilité accrue et une plus grande affinité pour les protéoglycanes de l'intima facilitant ainsi leur rétention dans la paroi artérielle. En outre, ils réduisent la vasodilatation endothéliale induite par l'acétylcholine (221). Une autre modification qualitative importante observée chez le patient diabétique de type 2 est l'augmentation des LDL oxydées (239). Ces dernières ont un caractère particulièrement athérogène puisqu'elles favorisent le chimiotactisme vis-à-vis des monocytes, la production par l'endothélium de molécules d'adhésion telles inter cellular adhesion molecule 1(ICAM-1), le relargage par les macrophages de cytokines (tumor necrosis factor (TNF α), interleukine (IL)-1, etc), alimentant la réaction inflammatoire propice au développement de l'athérosclérose. En outre, les LDL oxydées sont captées préférentiellement par les macrophages, donnant ainsi naissance aux cellules spumeuses. Parmi les autres modifications qualitatives, mentionnons la glycation de l'apoB susceptible de réduire sa liaison aux récepteurs B/E et de favoriser la captation des LDL par les récepteurs scavenger des macrophages. De plus, les LDL glyquées seraient oxydées plus facilement (213,221).

Au sein des HDL

Le diabète de type 2 est associé à une diminution de taux plasmatique d'HDL-C, prédominant sur la sous-fraction HDL₂, qui apparait étroitement corrélée à l'hypertriglycéridémie d'une part, et à l'obésité d'autre part (240). La réduction du HDL-C est liée à l'accroissement de son catabolisme en partie favorisée par une augmentation de l'activité de la lipase hépatique, enzyme en cause dans le catabolisme des HDL (241). L'augmentation des lipoprotéines riches en triglycérides, observée au cours du diabète de type 2, favorise, via la CETP, le transfert des triglycérides vers les HDL et les particules HDL, ainsi enrichies en triglycérides, deviennent d'excellents substrats pour la lipase hépatique avec pour conséquence un accroissement de leur catabolisme.

Il est par ailleurs, observé des modifications qualitatives des particules HDL tel que leur enrichissement en triglycérides et la glycation de l'apoA1, susceptibles de réduire l'efficacité de la voie de retour du cholestérol, dans le diabète de type 2.

Au sein des protéines de transfert

L'enrichissement en triglycérides des LDL et des HDL témoigne d'un transfert lipidique accru entre les différentes lipoprotéines, très vraisemblablement via la CETP, dont l'activité a été retrouvée augmentée dans plusieurs études(242).

Les données sur la PLTP, au cours du diabète, sont encore peu nombreuses, mais une hausse de son activité et de sa masse a été rapportée chez des patients diabétique de type 2 (242). Nous ne connaissons pas encore les conséquences de cette augmentation de la PLTP.

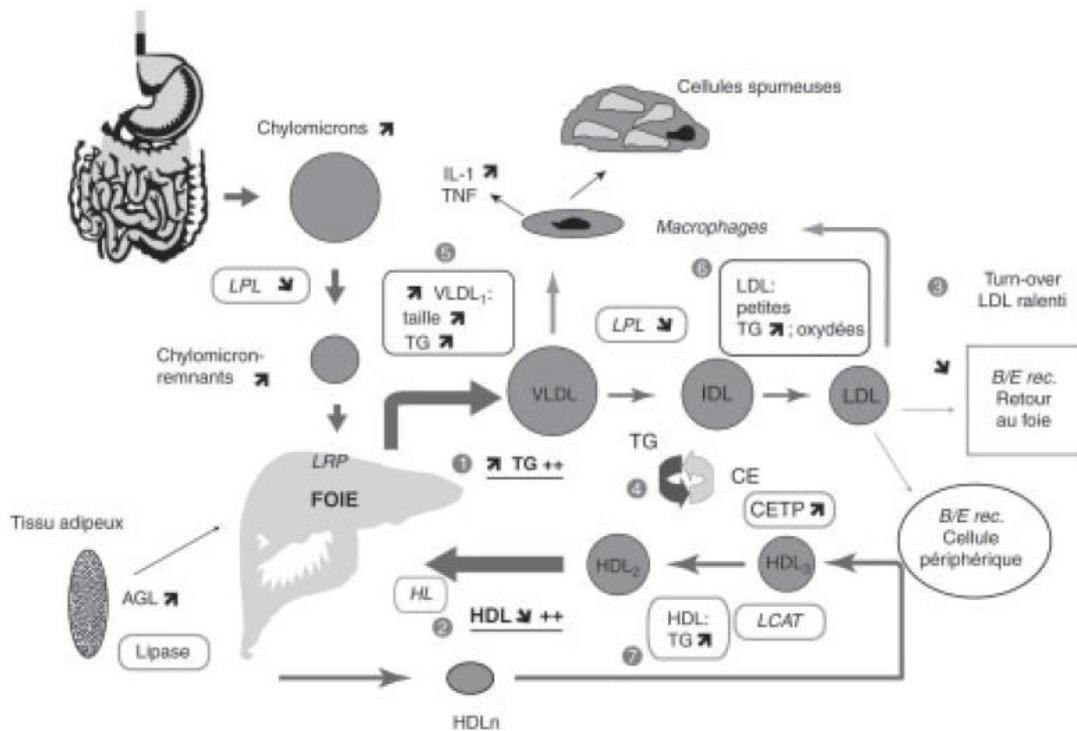


Figure 11. Principales anomalies du métabolisme des lipoprotéines au cours du diabète de type 2 (d'après Vergès)

- 1- Hypertriglycéridémie (augmentation de production des VLDL, diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en TG par diminution de l'activité de la LPL)
- 2- HDL-C bas (augmentation du catabolisme)
- 3- Ralentissement du turnover des LDL (diminution des LDL-R)
- 4- Transfert accru de TG entre les lipoprotéines riches en TG d'une part et les LDL, HDL d'autre part.
- 5- Prépondérance de VLDL1 (de grande taille, riches en TG) captées préférentiellement par les macrophages)
- 6- Prépondérance de LDL petites et denses (riches en TG) et de LDL oxydées, avec captation préférentielle par les macrophages
- 7- Enrichissement des HDL en TG

III- L'Apolipoprotéine C1

1- Structure de l'apoC1

L'apoC1 est la plus petite des apolipoprotéines C et a un poids moléculaire de 6600 daltons. Elle est composée de 57 acides aminés avec une thréonine en position N-terminale et une Sérine en position C-terminale. Elle contient 7 résidus lysine et 3 résidus arginine qui en font une protéine basique (pI=8,3). Elle ne contient pas d'histidine, ni de tyrosine, ni de cystéine, ni de carbohydate.

Sa composition en acides aminés est la suivante : THR-PRO-ASP-VAL-SER-SER-ALA-LEU-ASP-LYS-LEU-LYS-GLU-PHE-GLY-ASN-THR-LEU-GLU-ASP-LYS-ALA-ARG-GLU-LEU-ILE-SER-ARG-ILE-LYS-GLN-SER-GLU-LEU-SER-ALA-LYS-MET-ARG-GLU-TRP-PHE-SER-GLU-THR-PHE-GLN-LYS-LAL-LYS-GLU-LYS-LEU-LYS-ILE-ASP-SER (243–245).

Les résidus 7 à 29 et 38 à 52, qui correspondent aux 2 hélices α , jouent un rôle important dans sa liaison aux lipoprotéines (245). Sa structure tridimensionnelle est représentée sur la figure 12.

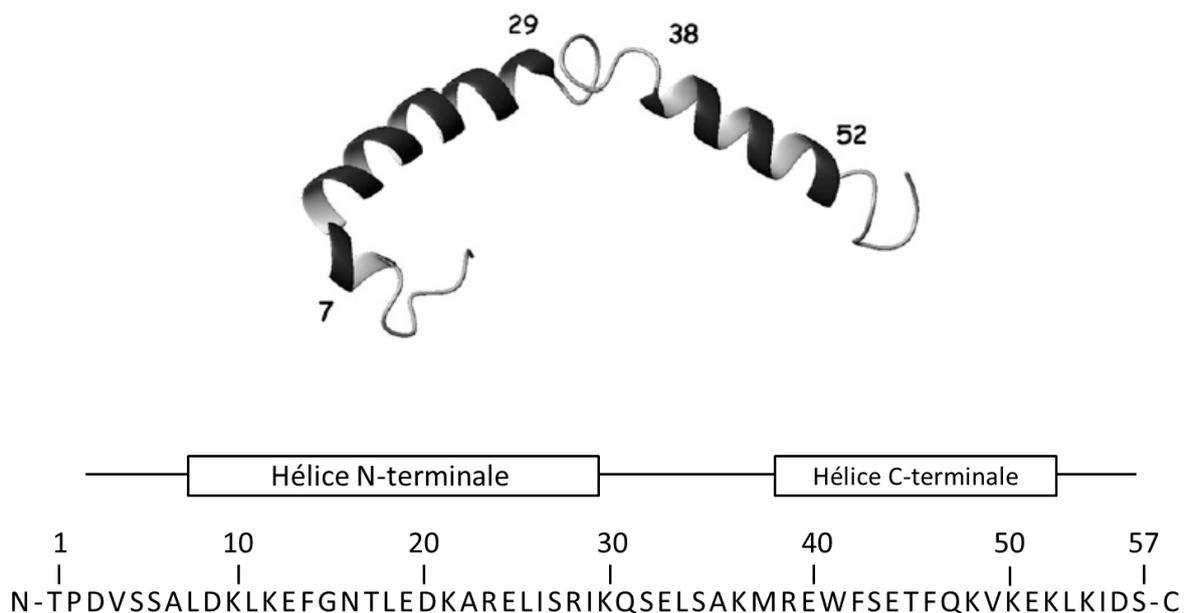


Figure 12. Structure de l'apoC1
Structure tridimensionnelle et séquence en polypeptides avec localisation des deux hélices α .

2- Répartition et concentration plasmatique de l'apoC1

Chez l'homme, l'apoC1 est principalement liée aux HDL, aux VLDL et aux chylomicrons (246,247). Chez les sujets normolipidémiques, les deux tiers de l'apoC1 totale sont liés aux HDL et un tiers est lié aux VLDL (246). Nous verrons, par la suite, que les états de dyslipidémie influencent la répartition de l'apoC1 sur les lipoprotéines.

La concentration plasmatique en apoC1 varie entre 4 et 12 mg/l chez les sujets normolipidémiques (246–250).

3- Gène de l'apoC1

Le gène de l'ApoC1 est localisé sur le chromosome 19, soit 4,3 kilobases (251–253), soit 5,3 kilobases (254) en amont du gène de l'ApoE, dans le même sens de transcription. Un pseudogène du gène de l'ApoC1, ApoC1', est localisée 7,5 kilobases en amont du gène de l'ApoC1 (Figure 13). Ces 2 gènes contiennent 4 exons et 3 introns. Le gène de l'ApoC1 est long de 4653 paires de base, alors que le gène ApoC1' est long de 4387 paires de bases. Dans chaque gène, le premier intron est localisé 20 nucléotides en aval du signal de départ de translation. Le gène de l'ApoC1 en aval code pour la protéine d'ApoC1 connue. Il diffère du gène ApoC1' pour environ 9% des nucléotides de ses exons. La principale différence se situe au niveau du troisième exon et entraîne un changement dans le codon pour la Glutamine qui introduit un signal stop de la translation dans le gène ApoC1' (254).

Le gène de l'ApoC1 est principalement exprimé dans le foie, mais également dans d'autres organes, notamment les poumons, la rate, la peau (Tableau 6). Il est activé lorsque les monocytes se différencient en macrophages. En revanche, il n'a jamais été détecté d'ARNm issu du gène ApoC1' dans aucun tissu. Cela laisse ainsi penser que le gène ApoC1' est un pseudogène (254).

La similarité de leur structure et leur proximité suggère que les gènes de l'ApoC1 et de l'ApoE dérivent d'un ancêtre commun. Les gènes de l'ApoE, ApoC1, ApoC2 et Apo C4 forment un cluster de gènes sur le chromosome 19 (19q13.2) d'environ 45 kpb (254,255).

La région de contrôle hépatique est située 17 kb en amont du gène de l'ApoE et 9 kb en amont du gène de l'ApoC1 et régule l'expression des gènes de l'ApoE et de l'ApoC1 dans le foie (256,257). Un second élément de contrôle hépatique a été identifié 27 kb en amont du gène de l'ApoE (258). Il a également été démontré que ces 2 régions de contrôle hépatiques

peuvent individuellement coordonner les 4 gènes du cluster APOE/C1/C2/C4 et que la présence d'un seul de ces éléments suffit à entraîner une expression hépatique significative de chacun de ces gènes (259).

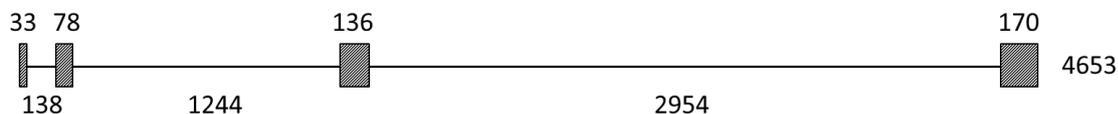


Figure 13. Structure du gène de l'apoC1.

Les quatre exons sont représentés en gris. Leur taille est exprimée en paires de bases.

Tableau 6: Distribution de l'ARNm de l'apoC1 dans les tissus

Tissu	Niveau d'ARN messager de l'apoC1 en %
Foie	100
Surrénales	<1
Cortex cérébral	5
Cervelet	2
Rein	4
Poumon	10
Testicules	5
Rate	19
Cœur	<1
Intestin grêle	3
Colon	6
Estomac	<1
Pancréas	<1

Le niveau d'ARNm d'apoC1 spécifique détecté dans le foie est désigné à 100%

4- Polymorphismes de l'apoC1

Il n'existe à ce jour que 2 polymorphismes décrits de l'apoC1.

Le premier polymorphisme décrit (260,261) est un site de restriction appelé HpaI, situé 317pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène de l'ApoC1. Ce site est produit par une insertion de 4 paires de bases CGTT. L'allèle H1 est l'allèle de délétion et correspond à l'absence du polymorphisme tandis que l'allèle H2 est l'allèle d'insertion et correspond à la présence de ce polymorphisme.

Il a été observé, chez des sujets porteurs de dysbétalipoprotéïnémies familiales (ou dyslipidémie de type III) que 97% des sujets homozygotes pour l'allèle $\epsilon 2$ de l'apoE étaient également homozygotes pour l'allèle H2 du polymorphisme HpaI (260). Cependant, dans une étude ultérieure (261) la même équipe n'a pas retrouvé cette association rendant le rôle de ce polymorphisme dans cette dyslipidémie incertain. Le rôle de ce polymorphisme dans le métabolisme des lipoprotéines semble tout de même exister puisqu'une association avec les particules remnantes des triglycérides a été mise en évidence (262).

En outre, il a été montré au sein d'une population de 404 américains d'origine africaine ou européenne que le polymorphisme Hpa I pouvait avoir une influence sur les taux plasmatiques de lipoprotéines. Chez les Afro-Américains porteurs du génotype ApoE $\epsilon 3/\epsilon 3$, les porteurs de l'allèle H2 avaient un taux de triglycérides 19% inférieur, d'ApoB 21% inférieur et de HDL-C 18% supérieur en comparaison aux sujets H1 homozygotes (263). Par contre, la présence de l'allèle H2 n'était associée à aucune modification des paramètres lipidiques chez les porteurs de l'allèle ApoE E4. Il a également été démontré au sein d'une population caucasienne que les sujets homozygotes pour HpaI avaient les taux de triglycérides les plus élevés (264).

Il a également été démontré que l'allèle H2 avait un effet positif sur la transcription de l'apoC1, avec une augmentation de 50% *in vitro* (263). Cependant, dans une étude menée chez 362 enfants d'origine hispanique, le taux plasmatique en apoC1 était 20% inférieur au reste de la population chez les sujets homozygotes pour l'allèle E3 de l'apoE et porteur d'un allèle H2, alors qu'aucune différence n'était observée chez les sujets homozygotes pour l'allèle E4 et porteur de H2 (265).

Plusieurs études ont également montré un déséquilibre de liaison entre ces 2 allèles H1 et H2 et les allèles de l'ApoE (3 allèles : $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$). Le déséquilibre de liaison est la situation

dans laquelle 2 allèles correspondant à 2 sites chromosomiques différents sont transmis ensemble plus souvent que le hasard ne le laisse prévoir.

L'allèle H1 est préférentiellement associé à l'allèle $\epsilon 3$ de l'ApoE, alors que l'allèle H2 est plus fréquemment associé aux allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 4$ dans une population d'américains d'origine européenne. Ainsi, la fréquence de l'allèle H2 avec l'allèle $\epsilon 2$ est de 0,98 dans l'étude de Xu et al. En outre, il existe un lien avec l'origine ethnique puisque, la fréquence de l'allèle H2 avec $\epsilon 4$ est de 0,85 chez les Américains d'origine caucasienne et de 0,55 chez les Afro-américains ($p < 0,001$). Il a également été retrouvé un déséquilibre de liaison plus intense entre les allèles de l'ApoC1 et de l'ApoE dans une population d'origine caucasienne en comparaison à une population d'origine africaine (266).

Ce déséquilibre de liaison rend difficile l'interprétation de l'effet de l'apoC1 sur le métabolisme lipidique. Il a ainsi été suggéré que les taux circulants d'apoC1 étaient influencés de manière prépondérante par le génotype de l'apoE et non par le polymorphisme HpaI (267).

Il a également été démontré que ce polymorphisme était associé à la maladie d'Alzheimer (268–270). Nous détaillerons ce point dans le paragraphe 7.

Le second polymorphisme décrit de l'apoC1 est le T45S au sein d'une population d'Indiens d'Amérique et de Mexicains (271). Le variant S45 est plus sujet à la coupure en N-terminal que le variant T45. De plus, il semble que la protéine S45 a une distribution plus importante sur les VLDL que la protéine T45 (271).

Il a également été démontré dans la même population que les sujets porteurs du variant S45 avaient un IMC moyen supérieur de 9% à celui des sujets porteurs du variant T45. En outre, la prévalence du diabète était plus élevée chez les parents des porteurs du variant S45 (272).

Ce polymorphisme a également été retrouvé au sein d'une population canadienne aborigène (273). L'allèle S45 (génotype S45/T45) était associé de manière significative à un pourcentage de masse grasse, un tour de taille, des taux plasmatiques de leptine et d'apoC1 plus bas que ceux des sujets porteurs du génotype T45/T45 (273). Ces données concernant l'allèle S45 sont contradictoires, mais ce phénomène de flip-flop a déjà été décrit et peut être lié au fait que le polymorphisme s'exprime dans deux groupes ethniques différents avec un fond génétique et un environnement différents (274).

En somme, seuls deux polymorphismes de l'apoC1 ont été découverts jusqu'ici. Le polymorphisme Hpa-I présente un déséquilibre de liaison avec les allèles de l'apoE. Le polymorphisme HpaI semble influencer le métabolisme des lipoprotéines, la survenue de la maladie d'Alzheimer et l'expression de l'apoC1. Le second polymorphisme T45S semble également influencer l'expression de l'apoC1 et a un impact sur l'obésité.

5- ApoC1 et Métabolisme lipidique

5-1 Rôle de l'apoC1 dans le métabolisme des VLDL

Il a été montré, *in vitro*, dans des modèles de foie isolé-perfusé de rat, que l'ajout d'apoC1 humaine à des émulsions de chylomicrons (275) ou de triglycérides (276) entraînait une inhibition de leur captation hépatique. Il a ensuite été démontré que l'apoC1 inhibait la liaison dépendante de l'apoE, de β -VLDL au récepteur LRP (277,278). Il a été suggéré que cette action inhibitrice de l'apoC1 sur la liaison des lipoprotéines au récepteur LRP était liée au déplacement de l'apoE de sa lipoprotéine. Il a alors été démontré que des peptides synthétiques d'apoC1 étaient capables de déplacer des quantités significatives d'apoE des β -VLDL et d'inhiber la liaison des β -VLDL au récepteur LRP (279).

Il a également été démontré *in vitro* que l'apoC1 pouvait altérer la liaison médiée par l'apoE, des VLDL au LDL-R (280,281), soit en masquant l'apoE, soit en changeant la conformation de l'apoE (280). Il semble que l'excès relatif d'apoC1 par rapport à l'apoE joue également un rôle significatif.

Ces études *in vitro* permettent de conclure que l'apoC1 inhibe la captation hépatique des lipoprotéines riches en triglycérides par une altération de la liaison de ces lipoprotéines soit au LDL-R soit au récepteur LRP.

Des souris surexprimant l'apoC1 humaine ont alors été générées pour étudier l'influence de l'apoC1 sur la clairance des lipoprotéines *in vivo*.

Ces souris transgéniques surexprimant l'apoC1 humaine présentent toutes une augmentation de leur taux plasmatique de triglycérides et une augmentation plus modeste de leur taux plasmatique de cholestérol total (282–284). Cette augmentation des taux de triglycérides est liée à une augmentation importante des taux de VLDL (284,285).

Une étude qui comparait des souris transgéniques apoC1^{-/-}, apoC1^{+/-} et apoC1^{+/+} a montré que l'élévation des taux plasmatiques de triglycérides se faisait de manière dose-dépendante à l'expression du gène de l'apoC1 (286).

Une étude menée chez des souris exprimant l'apoC1 humaine a retrouvé comme prévu une élévation des taux sériques de triglycérides et de cholestérol total en comparaison aux souris contrôles (285). L'élévation des triglycérides était principalement liée aux VLDL. Il a alors été démontré que l'élimination des VLDL était moins efficace chez les souris transgéniques pour l'apoC1. Il n'y avait aucune différence dans la production hépatique des VLDL, et dans l'hydrolyse des VLDL (285). Cela permet donc de conclure que l'apoC1 inhibe l'élimination hépatique des particules VLDL. Notons que cette diminution de la clairance des VLDL chez ces souris transgéniques avait déjà été démontrée (283).

Pour déterminer le récepteur hépatique impliqué dans cette inhibition de la clairance hépatique des VLDL liée à l'apoC1, des souris déficientes en LDL-R ont été générées. Les souris transgéniques déficientes en LDL-R et surexprimant l'apoC1 humaine présentaient des taux plasmatiques de triglycérides et de cholestérol total beaucoup plus importants que les souris uniquement déficientes en LDL-R, indiquant que l'effet inhibiteur de l'apoC1 sur la captation hépatique des VLDL passe par une autre voie que le LDL-R. Dans la mesure, où la surexpression de la *receptor associated protein* (RAP) était connue pour bloquer la liaison des ligands au LRP, la RAP a été transfectée dans les modèles transgéniques décrits auparavant. Cette transfection entraînait une élévation des taux plasmatique de triglycérides et de cholestérol chez les souris déficientes en LDL-R, mais pas chez les souris déficientes en LDL-R et exprimant l'apoC1 humaine. Cette étude permettait de conclure que l'apoC1, au moins en l'absence du LDL-R, inhibait la captation hépatique des VLDL par une voie sensible à RAP, qui était probablement le récepteur LRP (285).

Le récepteur des VLDL (VLDL-R) est très similaire au LDL-R dans sa structure mais son expression est très différente dans les tissus. Le LDL-R est abondant dans le foie, alors que le VLDL-R est fortement exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux (287,288). Le VLDL-R est présent dans l'endothélium des capillaires et des petites artérioles (289). Le VLDL-R se lie avec une forte affinité aux lipoprotéines contenant de l'ApoE, à savoir les chylomicrons, les VLDL et les IDL, mais pas les LDL (287–290). L'effet de l'ApoC1 sur la liaison des lipoprotéines au VLDL-R a été étudié chez des souris transgéniques surexprimant l'apoC1 humaine. Il a été démontré que la surexpression de

VLDL-R chez ces souris transgéniques, exprimant le LDL-R ou déficientes en LDL-R n'avait aucun effet sur l'hyperlipidémie observée chez ces souris. Cela indique que l'apoC1 inhibe la liaison des lipoprotéines au récepteur VLDL-R (291).

Cependant, il a été démontré que des souris déficientes en apoE et surexprimant l'apoC1 humaine présentent une hypertriglycéridémie majeure. Cela montre donc que ce phénotype hyperlipidémique passe par une voie que l'inhibition de la clairance hépatique des lipoprotéines médiée par l'apoE (292,293). Il avait été démontré *in vitro* dans une étude ancienne que l'apoC1 pouvait inhiber la LPL (294). Cette action inhibitrice de l'apoC1 sur l'activité de la LPL a été confirmée *in vivo* dans un modèle de souris transgéniques mais aussi *in vitro* (292). Ainsi, *in vitro*, l'apoC1 inhibait la LPL avec une efficacité de 60% en comparaison à l'apoC3 qui est le principal inhibiteur endogène de la LPL. Notons que l'apoC1 n'avait pas d'effet sur la masse de LPL.

Cet effet inhibiteur de l'apoC1 sur l'activité de la LPL a également été démontré *in vivo* dans une étude menée chez des souris transgéniques exprimant l'apoC1 humaine et déficientes en apoE (286). Cette étude a également montré que ces souris transgéniques présentaient une augmentation de la production hépatique de VLDL.

Dans la mesure où l'ApoC3 est le principal inhibiteur endogène connu de la LPL (295,296) et que le VLDL-R (297,298) peut également moduler l'activité de la LPL, une équipe a voulu savoir si l'action inhibitrice de l'apoC1 sur la LPL était liée à un effet direct de l'apoC1 ou à un effet par l'intermédiaire de l'apoC3 ou du VLDL-R (299). Un adénovirus recombinant permettant l'expression spécifique d'apoC1 dans le foie a été utilisé. Il entraînait les mêmes perturbations lipidiques que celles observées chez les souris transgéniques exprimant l'apoC1 humaine. Ainsi, une augmentation dose dépendante des taux de triglycérides était observée (jusqu'à 6,6 fois le taux des souris contrôles).

L'expression de l'apoC1 chez des souris déficientes en VLDL-R mais aussi déficientes en LDL-R et en récepteur LRP entraînait une augmentation significative des taux de triglycérides (4,1 fois celle des contrôles). La même observation était faite chez des souris déficientes en apoC3 et en apoE (6,6 fois celle des contrôles). Cela permet donc de conclure que l'action inhibitrice de l'apoC1 sur la LPL est indépendante de l'apoC3 et du VLDL-R.

Le rôle de l'apoC1 sur l'activité de la LPL a été confirmé chez l'homme. Une étude a été menée chez 28 sujets insuffisants rénaux, hémodialysés (300). Il a été montré que

l'appauvrissement des VLDL en apoC1, observé après une séance de dialyse, faisait des VLDL des meilleurs substrats pour la LPL *in vitro*.

Des études *in vitro* anciennes avaient montré que l'apoC1 interférait avec le métabolisme des VLDL en inhibant la lipase hépatique (301).

Conde-Knape (293) a confirmé un effet modulateur de la lipase hépatique par l'apoC1 *in vitro* et a suggéré que cette modulation de la lipase hépatique pouvait contribuer au phénotype hyperlipidémique des souris surexprimant l'apoC1. Cependant, les souris déficientes en lipase hépatique ne montrent aucune perturbation du métabolisme des triglycérides (302–304).

En outre, des souris transgéniques exprimant la LCAT ne présentent pas d'élévation de leur taux circulant de VLDL (305), suggérant que les propriétés potentielles de l'apoC1 d'activation de la LCAT ne contribuent pas au phénotype des souris transgéniques exprimant l'apoC1 humaine.

Une autre voie utilisée pour comprendre le rôle de l'apoC1 dans le métabolisme des lipoprotéines a été le développement des souris déficientes pour l'apoC1. La première équipe (306) à générer de telles cellules a mis en évidence que ces souris déficientes en apoC1 et soumises à un régime standard ou modérément hypercholestérolémiant présentaient une augmentation de leur taux de triglycérides de 60% en comparaison aux souris contrôles. Les souris soumises au régime modérément hypercholestérolémiant présentaient également une diminution du taux de HDL-C et une multiplication par 3 de leur taux de VLDL et de LDL en comparaison aux contrôles. Lorsque ces souris déficientes en apoC1 sont soumises à un régime très athérogène, elles présentent un taux de cholestérol 2 fois supérieur à celui des souris contrôles avec le même régime. Une étude *in vitro* a montré que les lipoprotéines (de densité <1,006 g/ml) issues des souris déficientes en apoC1 avaient une capacité de liaison au LDL-R inférieure à celle des lipoprotéines des souris contrôles. Les données chez ces souris déficientes en apoC1 vont à l'encontre des résultats attendus (diminution des paramètres lipidiques) au vu des données disponibles chez les souris surexprimant l'apoC1 humaine.

Une étude a alors étudié le turnover des VLDL chez des souris déficientes en ApoC1 et des souris contrôles (307). Ces souris étaient soumises à un régime riche en sucre pour stimuler la production hépatique de VLDL. Les souris déficientes en ApoC1 présentaient une diminution de la clairance des VLDL de l'ordre de 50% par rapport aux souris contrôles. Il

n'existait pas de différence de production, ni de lipolyse des VLDL entre les 2 groupes de souris, ce qui laisse penser que cette diminution du catabolisme est lié à une diminution de la captation hépatique des VLDL. Les mécanismes de cette diminution de la captation hépatique restent inconnus. Notons que dans cette étude, les taux de triglycérides et de cholestérol n'étaient pas significativement différents entre les souris contrôles et celles déficientes en apoC1.

Une autre étude a montré une tendance, sans qu'elle soit significative, à la diminution des taux de cholestérol total et de triglycérides chez des souris déficientes en apoC1 en comparaison à des souris contrôles (308).

Néanmoins, il a été démontré une diminution significative des taux de cholestérol total et d'acides gras libres, mais pas de triglycérides chez des souris déficientes en apoC1 (309).

En somme, l'apoC1 influence le métabolisme des VLDL comme le montre l'élévation marquée des taux plasmatiques de triglycérides et plus modeste des taux plasmatiques de cholestérol total observé chez les souris transgéniques exprimant l'apoC1 humaine.

Ce phénotype lipidique peut s'expliquer par un effet inhibiteur de l'apoC1 sur les récepteurs hépatiques LDL-R, LRP responsable d'une diminution de la captation hépatique des VLDL mais aussi sur le VLDL-R, présent de manière prépondérante dans les tissus périphériques.

Le deuxième mécanisme évoqué est une action inhibitrice de l'apoC1 sur l'activité de la LPL, indépendante du VLDL-R et de l'ApoC3, inhibiteurs connus de l'activité de la LPL. Certains auteurs estiment que ce mécanisme est le plus important pour expliquer l'hypertriglycéridémie présentée par ces souris transgéniques.

Le troisième mécanisme possible est une augmentation de la production hépatique de VLDL liée à l'apoC1.

Ces résultats sont à mettre en perspective avec ceux observés chez les souris déficientes en apoC1 qui ne présentent pas de diminution de leurs paramètres lipidiques comme cela aurait été attendu, et qui présentent même une hypercholestérolémie lorsqu'elles sont soumises à un régime athérogène.

5-2 Rôle de l'apoC1 dans le métabolisme des HDL

Des études *in vitro* ont montré que l'ApoC1 pouvait avoir un rôle sur le métabolisme HDL. En effet, l'ApoC1 active partiellement la LCAT (310,311). L'activation de la LCAT est connue pour entraîner une augmentation des taux plasmatique de HDL et de la taille des HDL. Il a ainsi été démontré que des souris déficientes en ApoC1 présentaient une diminution du HDL de 29% en comparaison aux souris témoins (312), mais l'activité de la LCAT n'a pas été étudiée au cours de cette étude. La pertinence *in vivo* de ces observations *in vitro* est donc inconnue.

Dans la mesure où il a été démontré que l'apoC2 et l'apoC3 étaient des inhibiteurs de la captation hépatique des esters de cholestérol des HDL par le récepteur scavenger B1 (SR-B1) (313), l'effet de l'apoC1 sur SR-B1 a été étudié *in vitro*. Il a ainsi été démontré que la présence d'apoC1 diminuait fortement la liaison d'esters de cholestérol à SR-B1, démontrant l'effet inhibiteur *in vitro* de l'apoC1 sur SR-B1.

L'apoC1 joue également un rôle majeur dans l'activité de la CETP que nous détaillerons dans le prochain chapitre.

5-3 ApoC1 et activité CETP

Comme nous l'avons vu précédemment, la CETP est une protéine de transfert permettant les échanges d'esters de cholestérol et de TG entre les HDL et les lipoprotéines riches en triglycérides. Il a été démontré que les HDL possédaient un effet inhibiteur de l'activité de la CETP (314). L'implication des apolipoprotéines des HDL dans cet effet inhibiteur a été évoquée. Il a ainsi été démontré que l'apoA1 et l'apoA2 pouvaient avoir une capacité modulatrice de l'activité CETP, soit neutre, soit activatrice, soit inhibitrice. Cependant, ces deux apolipoprotéines n'avaient pas de capacité inhibitrice notable.

Une étude *in vitro* a alors pu identifier l'apolipoprotéine liée aux HDL responsable de cet effet inhibiteur des HDL sur l'activité CETP (315). Les apolipoprotéines liées aux HDL humaines ont ainsi été fractionnées par électrophorèse et 30 fractions protéiques distinctes avec une masse moléculaire allant de 2 à 80 kDa ont été isolées. La capacité de chaque fraction protéique à inhiber l'activité de la CETP a été testée. Un seul fragment était capable d'inhiber complètement l'activité CETP. L'extrémité N-terminale de ce fragment d'environ 6 kDa correspondait à l'extrémité N-terminale de l'ApoC1. La capacité d'inhibition de l'activité CETP de ce fragment était complètement perdue par l'ajout d'un anticorps anti-ApoC1.

L'analyse en spectrométrie de masse confirmait que ce fragment correspondait exactement à l'ApoC1. L'ApoC1 purifiée présentait une capacité d'inhibition de la CETP dose-dépendante et très efficace ($IC_{50}=100\text{nmol/L}$). Lorsque l'ensemble des apolipoprotéines liées aux HDL étaient traitées par des anticorps anti-ApoC1, aucun effet inhibiteur sur l'activité CETP n'était observé. La privation des HDL en ApoC1 par passage en chromatographie d'affinité entraînait une augmentation des taux de transfert en esters de cholestérol de l'ordre de 43%. Cette étude *in vitro* a donc identifié l'apoC1 comme l'apolipoprotéine responsable de l'inhibition de l'activité CETP. Cette capacité d'inhibition dose dépendante est observée pour l'apoC1 isolée mais aussi liée aux HDL. Cette capacité d'inhibition est localisée sur les HDL et non pas sur les LDL, les LDL isolés n'ayant aucune capacité d'inhibition de la CETP. Il a également été démontré chez l'homme que l'apoC1 liée aux VLDL n'avait pas de capacité d'inhibition de la CETP *in vitro* (300).

La même équipe a alors menée des études *in vivo* pour confirmer le rôle d'inhibition de l'apoC1 sur l'activité CETP.

La première étude a été menée chez des souris transgéniques exprimant la CETP humaine (HuCETPTg) (notons que les souris sont naturellement dépourvues de CETP) et déficientes en apoC1 (apoC1-KO) (308). Une analyse chromatographique a permis de mettre en évidence un contenu en esters de cholestérol 6,1 fois plus important dans les VLDL des souris HuCETPTg/apoC1-KO en comparaison aux souris contrôles. Chez les souris HuCETPTg, l'augmentation du contenu des VLDL en esters de cholestérol n'était que de 2,7 par rapport aux souris contrôles. Une diminution d'environ 50% du contenu en esters de cholestérol et du ratio EC/TG des HDL était observée chez les souris HuCETPTg/apoC1-KO, en comparaison aux souris contrôles, alors que cette diminution n'était que de l'ordre de 20% chez les souris HuCETPTg. De plus, l'activité CETP spécifique (activité CETP rapportée à la masse CETP) était nettement plus importante chez les souris HuCETPTg/apoC1-KO que chez les souris HuCETPTg (173 ± 75 vs 72 ± 19 pmol/ug/h, $p<0,05$). Enfin, *in vitro*, les HDL de souris HuCETPTg/apoC1-KO interagissaient plus facilement avec de la CETP purifiée que les HDL des souris HuCETPTg, alors que ces HDL ne différaient que par leur contenu en apoC1.

L'effet de la surexpression d'ApoC1 sur l'activité de la CETP a ensuite été étudié chez des souris transgéniques exprimant à la fois l'ApoC1 humaine et la CETP humaine (souris CETPTg/apoC1Tg) (316). Les souris CETPTg/apoC1Tg présentaient une diminution par deux de leur activité CETP par rapport aux souris CETPTg.

Une étude s'est alors intéressée aux mécanismes moléculaires de l'inhibition de l'activité CETP par l'ApoC1 (317).

Cette étude *in vitro* réalisée à partir de plasma de sujets normolipidémiques a montré que la capacité d'inhibition de l'apoC1 était indépendante de la quantité de CETP, mais fortement dépendante de la quantité de HDL introduite dans les mélanges d'incubation. Ainsi, plus la quantité de HDL ajoutée était élevée, plus la capacité d'inhibition de l'activité CETP diminuait. Il a ensuite été démontré que l'apoC1 purifiée modifiait la charge électrique des HDL. Plus la quantité d'apoC1 ajoutée aux HDL était importante, moins les HDL étaient électronégatives. Comme l'apoC1 est une protéine basique, riche en résidus lysine et arginine chargés positivement, l'effet de sa charge électrique sur sa capacité d'inhibition de l'apoC1 a été étudié. L'apoC1 a ainsi été traitée avec un agent bloquant les résidus lysine (acétylation), chargés positivement. L'isoélectrofocalisation de l'apoC1 a montré que l'acétylation de l'apoC1 entraînait l'apparition de nouvelles isoformes d'apoC1. L'apoC1 native présentait une seule isoforme à 8,3 de pI alors que l'apoC1 traitée avec la plus grande quantité de produit acétylant présentait une seule isoforme à 3,2 de pI. Il était également démontré que plus l'apoC1 était acétylée, plus elle perdait sa capacité d'inhibition de la CETP.

En outre, contrairement à l'apoC1 native, l'apoC1 acétylée n'entraînait pas de modification de la charge électrique des HDL, à concentration équivalente. Deux fragments d'apoC1 ont été synthétisés correspondant aux 2 hélices α de l'apoC1. Le fragment C-terminal possédait une capacité d'inhibition de la CETP, même si elle était moins forte que l'apoC1 entière alors que le fragment N-terminal n'avait aucune capacité d'inhibition de l'activité CETP. De plus, le fragment C-terminal était capable de diminuer l'électronegativité des HDL, alors que le fragment N-terminal ne l'était pas. Enfin, l'apoC1 native entraînait *in vitro* une dissociation de complexes CETP-HDL de manière dose-dépendante. Le fragment C-terminal possédait cette capacité de dissociation, même si elle était 3 fois inférieure à celle de l'apoC1 native, alors que le fragment N-terminal n'entraînait pas de dissociation de ces complexes CETP-HDL. Le fragment C-terminal de l'apoC1 se caractérise par sa richesse en résidus lysine (n=5) chargés positivement.

Cette étude montre donc que la charge électrostatique de l'apoC1 joue un rôle important dans sa capacité d'inhibition de la CETP. L'apoC1 entraîne une diminution de l'électronegativité des HDL et une diminution de la liaison de la CETP aux HDL. Cette observation vient confirmer le rôle clé que constitue le potentiel de surface dans l'interaction de la CETP avec la surface des lipoprotéines. Il a en effet été démontré que le changement du potentiel de surface des HDL par des modifications électrochimiques ou des substitutions

d'apolipoprotéines entraîne une perturbation des transferts lipidiques liés à la CETP (318–320).

Notons qu'il a été démontré que l'apoC1 de lapin ne possède pas de capacité d'inhibition de la CETP, et ne modifie pas la charge électrostatique des HDL (321). Cette observation est importante car les lapins sont un modèle animal souvent utilisé pour étudier l'athérosclérose.

Cet effet inhibiteur de l'apoC1 sur l'activité CETP a été confirmé *in vivo* chez l'homme (321). Il a été mis en évidence chez 28 sujets sains normolipidémiques, une forte corrélation négative entre leur concentration plasmatique en apoC1 et leur activité CETP spécifique. L'utilisation de l'activité spécifique de la CETP permet de s'amender de la masse CETP qui influence également l'activité de transfert des esters de cholestérol.

En somme, l'apoC1 est un inhibiteur physiologique de la CETP. Son action inhibitrice est liée au moins en partie à sa charge positive, responsable d'une diminution de l'électronégativité des HDL, qui diminue la liaison des HDL avec la CETP et donc l'activité de la CETP. Seule l'apoC1 liée aux HDL possède une action inhibitrice.

5-4 Influence des dyslipidémies sur la répartition et la concentration plasmatiques en apoC1

Une étude menée chez une petite population de sujets normolipidémiques (n=6) a confirmé que l'apoC1 était localisée sur les HDL et les VLDL avec très forte prédominance sur les HDL (92%) (247). Il faut noter qu'une faible proportion de l'apoC1 était retrouvée sur les IDL+LDL (2,2%).

Au cours de cette étude, il a été montré que la présence d'une dyslipidémie impactait la répartition de l'apoC1 sur les lipoprotéines. La quantité d'apoC1 liée aux VLDL était significativement augmentée, alors que la quantité d'apoC1 liée aux HDL n'était pas modifiée chez les sujets présentant une hypertriglycéridémie ou une hyperlipidémie mixte. En revanche, la répartition de l'apoC1 était fortement perturbée puisque 92% de l'apoC1 totale était localisée sur les HDL chez les sujets normolipidémiques, alors que seulement 46% et 49% l'était respectivement chez les sujets avec une hypertriglycéridémie et avec une hyperlipidémie mixte.

La cinétique de l'apoC1 a été évaluée au cours de cette étude et il a été démontré que la production d'apoC1 liée aux VLDL était augmentée chez les sujets présentant une dyslipidémie (10 à 15 fois) en comparaison au sujets normolipidémiques, alors que le temps de résidence plasmatique de l'apoC1 liée aux VLDL n'était pas modifié.

Une autre étude cinétique de l'apoC1 a montré chez 4 sujets normolipidémiques que le temps de résidence de l'ApoC1 était de 3,2 jours et que le taux plasmatique de production était de 1,8 mg/kg/jour (322).

Il a été démontré dans plusieurs études (246–249) que la concentration plasmatique en apoC1 était augmentée en cas d'hypertriglycéridémie chez l'homme. Ainsi, dans l'étude de Cohn et al (247), la concentration plasmatique en apoC1 était significativement plus élevée chez les sujets hypertriglycéridémiques (n=4) ($12,5 \pm 1,2$ mg/dl) et avec une hyperlipidémie mixte (n=4) ($12,4 \pm 1,3$ mg/dl) que chez les sujets normolipidémiques (n=6) ($7,9 \pm 0,6$ mg/dl). Ces résultats sont concordants avec les observations faites chez les souris transgéniques exprimant l'apoC1 humaine et présentant une hypertriglycéridémie majeure.

En somme, l'hypertriglycéridémie s'accompagne d'une augmentation des taux plasmatiques d'apoC1 mais aussi de modification de la répartition de l'apoC1 sur les lipoprotéines. Elle est associée de manière prédominante aux HDL dans les états de normolipidémie alors que la liaison aux VLDL est significativement augmentée en cas d'hypertriglycéridémie ou d'hyperlipidémie mixte.

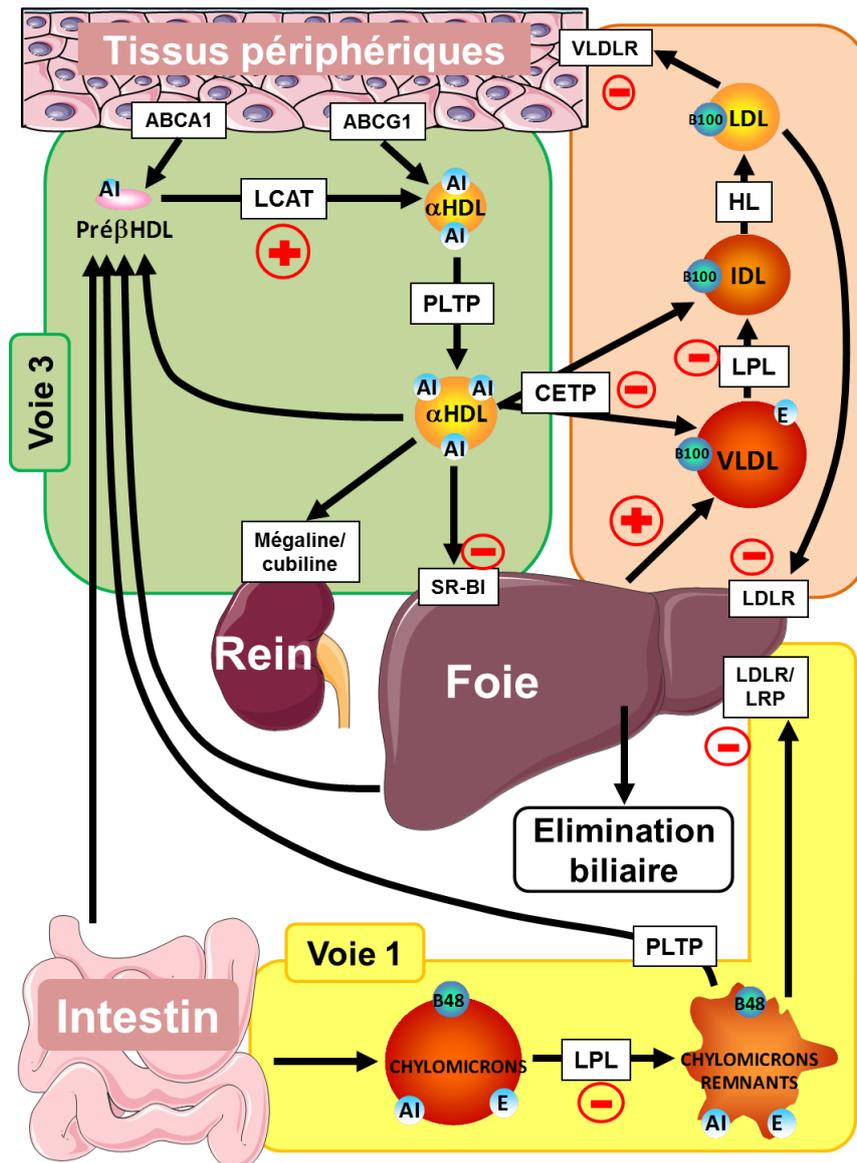


Figure 14. Influence de l'apoC1 sur le métabolisme des lipoprotéines.

L'apoC1 a une action sur le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides et sur le métabolisme des HDL. L'apoC1 diminue l'activité de la LPL, diminue la liaison des lipoprotéines riches en triglycérides à leurs récepteurs cellulaires (LDL-R, LRP et VLDL-R) et stimule la production hépatique de VLDL. L'apoC1 est un inhibiteur physiologique de la CETP. L'apoC1 stimule l'activité de la LCAT et inhibe le récepteur SR-BI.

6- ApoC1 et tissu adipeux

En dehors des modifications lipidiques connus, il a été démontré que des souris transgéniques surexprimant l'ApoC1 humaine présentaient des anomalies cutanées. Elles présentaient une peau sèche et squameuse et une perte de poils dont l'importante était dépendante du niveau d'expression de l'ApoC1 dans la peau. Ces anomalies étaient retrouvées dans 2 lignées fondatrices indépendantes permettant d'exclure l'hypothèse d'une mutation du site d'insertion du gène de l'ApoC1. L'analyse histologique cutanée chez les

souris ayant une haute expression d'ApoC1 retrouvait une hyperplasie de l'épiderme et une hyperkératose et une atrophie des glandes sébacées avec un manque de sébum. L'analyse lipidique de l'épiderme objectivait une diminution de 60% des TG et de 45% des esters de wax (2 composants du sébum) chez les souris avec haute expression d'ApoC1.

Enfin, ces souris exprimant l'ApoC1 humaine présentaient une diminution de 60% de leur réserves en tissu adipeux abdominal et un déficit complet en graisse sous cutanée.

Ces données montrent donc que l'ApoC1 affecte la synthèse lipidique au niveau cutané et la formation du tissu adipeux.

Une étude a alors essayé de déterminer si l'ApoC1 pouvait avoir un impact sur l'obésité (323). Elle a d'abord confirmé que les souris surexprimant l'ApoC1 ont une diminution de 50% de la captation d'un analogue des AG et ce uniquement dans le tissu adipeux blanc. Cette étude a observé l'effet de l'ApoC1 sur l'obésité et l'insulinorésistance en comparant des souris ob/ob (déficiente en leptine et donc obèse) ou WT surexprimant chacune l'ApoC1 humaine. Les souris ob/ob exprimant l'ApoC1 avaient une diminution significative de leur poids (21 ± 4 vs 44 ± 7 g), de leur tissu adipeux total (15 ± 3 vs 25 ± 3 %) et de la taille moyenne de leur adipocytes. Ces souris présentaient également une augmentation de leurs concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol total et acides gras libres, en comparaison aux souris ob/ob. Les souris ob/ob surexprimant l'ApoC1 présentaient également une glycémie moyenne nettement inférieure à celle des souris ob/ob témoins et une meilleure réponse au test de tolérance au glucose. Les souris surexprimant l'ApoC1 humaine semblaient donc être protégées contre l'obésité et l'insulinorésistance. Notons qu'une autre étude a montré que le clamp euglycémique (technique de référence de l'étude de l'insulinorésistance) était comparable entre des souris exprimant l'apoC1 humaine et des souris contrôles (324).

Des résultats opposés ont été retrouvés dans une étude menée chez des souris ob/ob exprimant l'apoC1 humaine de manière hétérozygote (325). En effet, alors qu'elles présentaient comme attendu, une élévation des taux de triglycérides, de cholestérol total, d'acides gras libres et une diminution de leur poids, contrairement au modèle précédent elles présentaient une élévation de leur glycémie, de leur insulinémie et une insulinorésistance générale et hépatique en comparaison aux souris ob/ob. De plus, leur contenu hépatique en triglycérides et leur captation hépatique des acides gras libres étaient augmentés. Les mécanismes de cette élévation du contenu hépatique en acides gras et de cette insulinorésistance ne sont pas élucidés.

Ces résultats sont à pondérer par ceux retrouvés dans une étude qui a mis en évidence chez des souris déficientes en apoC1 une augmentation significative de leur contenu hépatique en esters de cholestérol et en triglycérides (309).

Une hypothèse a été apportée pour expliquer la diminution des acides gras dans le tissu adipeux. Il a en effet été démontré que la transplantation de peau d'une souris surexprimant l'apoC1 (et présentant des altérations cutanées) à une souris contrôle n'entraîne aucune diminution des modifications cutanée. La transplantation de peau d'une souris wild type à une souris surexprimant l'apoC1 n'entraîne pas d'altération cutanée (326). Cela laisse donc penser que l'ApoC1 peut agir directement via des phénomènes locaux au niveau cutané. Il a alors été démontré *in vitro* (326) que la liaison d'acide oléique à des macrophages était moins importante lorsque ces macrophages étaient issus de souris surexprimant l'apoC1 humaine que des souris déficientes en apoC1. Il en résultait une diminution de l'estérification d'acide oléique en triglycérides et en esters de cholestérol dans les macrophages de souris exprimant l'apoC1. Il a également été montré que l'association de l'acide oléique à des macrophages de souris wild type était diminué lors de l'ajout d'ApoC1 alors que l'ajout d'ApoC1 mutant (où les résidus lysine sont remplacés par des résidus alanine) n'a aucun effet. Cela laisse présumer un rôle du motif de liaison chargé positivement de l'ApoC1. Enfin, il a été montré que la présence d'ApoC1 majorait la liaison d'émulsion de VLDL aux acides gras libres, alors que l'ApoC1 mutant n'avait pas d'influence. L'ApoC1 semble donc se lier aux acides gras libres circulants et diminuer ainsi sa capacité de captation par le tissu adipeux. Sa liaison aux acides gras libres pourrait faire intervenir son site de liaison riche en lysine, chargé positivement.

Une étude a voulu confirmer ces données animales chez l'homme (327). Il a été mis en évidence chez 98 hommes avec un syndrome métabolique (critères de l'IDF), une association entre des taux élevés d'apoC1 et d'apoC3 (au-delà de la médiane) et une élévation du taux de triglycérides et une diminution de la quantité de graisse viscérale. Ces deux apolipoprotéines ont été étudiées pour leur effet connu sur l'activité de la LPL. Cependant, cette corrélation est retrouvée lorsque les taux d'apoC1 et d'apoC3 sont conjointement augmentés, mais il n'y a pas de données disponibles uniquement avec l'apoC1.

En somme, les souris surexprimant l'apoC1 présentent des anomalies cutanées liées à une diminution majeure de leur graisse sous cutanée. Il semble de l'apoC1 diminue l'estérification des acides gras libres au niveau du tissu adipeux. La surexpression d'apoC1 humaine s'accompagne également d'une diminution de la graisse viscérale.

L'apoC1 semble également moduler le contenu hépatique en triglycérides et l'insulinorésistance, mais les résultats à ce sujet sont contradictoires à l'heure actuelle.

7- ApoC1 et fonctions cognitives

Nous avons vu que les allèles H1 et H2 de l'apoC1 présentaient un déséquilibre de liaison avec les allèles de l'apoE.

Or, il a été montré que l'allèle epsilon4 de l'ApoE (ApoE- ϵ 4) était un facteur de risque majeur du développement d'une maladie d'Alzheimer de début tardif, c'est-à-dire après 60 ans (328). Il a été démontré, dans 42 familles atteintes d'une maladie d'Alzheimer, que la proportion de sujets atteints par cette maladie est de 20% lorsqu'ils sont porteurs de l'allèle ϵ 2 et/ou ϵ 3 (génotype 2/3 ou 3/3). Cette proportion passe à 47% lorsqu'ils sont porteurs d'un allèle ϵ 4 (génotype 2/4 ou 3/4) et à 91% lorsqu'ils sont porteurs de 2 allèles ϵ 4 (génotype 4/4). Le risque de maladie d'Alzheimer est augmenté d'un facteur 2,84 pour chaque allèle ϵ 4 supplémentaire. L'augmentation du nombre d'allèles ϵ 4 s'accompagne également d'une diminution de l'âge d'apparition de la maladie d'Alzheimer. Cet âge passe de 84,3 ans sans allèle ϵ 4 à 68,4 avec 2 allèles ϵ 4 (328). Des gènes de susceptibilité de la maladie d'Alzheimer en rapport avec le métabolisme des lipoprotéines ont alors été recherchés.

Plusieurs auteurs (329–334) ont ainsi démontré que l'allèle H2 de l'ApoC1 était associé avec la maladie d'Alzheimer. Il a ainsi été montré que la fréquence de l'allèle H2 était de 0,45 dans une population de patients atteints de la maladie d'Alzheimer contre 0,14 dans une population contrôle (331). Il a également démontré que cette augmentation de fréquence de l'allèle de l'allèle H2 concernait les cas de maladie d'Alzheimer à la fois sporadique et familiaux (332). L'âge d'apparition de la maladie d'Alzheimer est également plus bas chez les hommes porteurs de l'allèle H2, en comparaison aux femmes. Les marqueurs génétiques de la maladie d'Alzheimer ont été étudiés chez 85 patients atteints de la maladie et dans une population contrôle de 156 sujets (334). Le risque de maladie d'Alzheimer est multiplié par 2,5 chez les porteurs de l'allèle H2 par rapport aux porteurs de l'allèle H1. Il est retrouvé une

association préférentielle de H2 avec les allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 4$ de l'ApoE et de H1 avec l'allèle $\epsilon 3$. Mais la fréquence de liaison entre H2 et maladie d'Alzheimer est retrouvée chez les sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ de l'ApoE mais aussi $\epsilon 3$, ce qui suggère que la présence de l'allèle H2 est un facteur de risque indépendant de la présence de l'allèle $\epsilon 4$ connu pour être également un facteur de risque majeur de la maladie d'Alzheimer.

Il existe également un lien entre le polymorphisme de l'ApoC1 et le statut neuropsychologique chez l'homme (335). Il a été démontré chez 58 sujets âgés atteints d'un déclin cognitif que la présence de l'allèle H2 était associée à de plus mauvaises fonctions de mémorisation (test MMSE, test de mémorisation verbale) et des lobes frontaux. En outre, une association entre l'allèle H2 et une diminution du volume de l'hippocampe chez l'homme a été mise en évidence lors d'autopsie (336).

Les liens entre les taux cérébraux (mesurés en post mortem) d'ARNm de l'ApoC1 et d'ApoC1 et le génotype de l'ApoC1 et de l'ApoE ont alors été étudié chez des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer en comparaison à une population témoin (337). Il est mis en évidence une diminution des taux d'ARNm de l'ApoC1 chez les sujets porteurs d'une maladie d'Alzheimer quelque soit leur génotype. Cette diminution est encore plus marquée pour les porteurs d'un allèle H2. Il a également été démontré que chez les sujets porteurs d'un allèle H2 avec une maladie d'Alzheimer, le taux d'ARNm de l'ApoC1 était plus bas de 65% par rapport aux contrôles, alors que le taux d'ApoC1 était plus élevé de 35%. Les sujets porteurs de H2 étaient principalement de génotype ApoE4. Cette direction opposée des taux d'ARNm et d'ApoC1 a été expliquée par une possible diminution de la clairance des lipoprotéines du système nerveux central liée à une liaison moins importante de l'ApoE4 à la surface cellulaire des protéoglycanes (338).

Notons que l'expression d'ARNm d'ApoC1 au niveau cérébral a été confirmée dans l'étude de Petit-Turcotte et al avec une localisation précise au niveau des astrocytes (337).

L'expression d'ARNm de l'ApoC1 dans le cerveau (252,254,337) et les liens connus entre ApoC1 et métabolisme lipoprotéique suggèrent que l'ApoC1 pourrait jouer un rôle dans le métabolisme lipidique cérébral. Nous avons montré précédemment que l'ApoC1 régulait plusieurs enzymes clés du métabolisme lipidique (286,292,315,339), enzymes également présentes au niveau cérébral. De plus, il a été démontré que les souris déficientes en ApoE présentaient une altération de leur fonction de mémorisation et d'apprentissage (340–343).

Une équipe hollandaise a ainsi développé des modèles de souris visant à explorer les implications de l'ApoC1 dans les fonctions cognitives.

Cette équipe a évalué, en post-mortem, la localisation cérébrale de l'ApoC1 chez des hommes atteints de maladie d'Alzheimer et dans une population contrôle. Dans les 2 groupes, l'ApoC1 est détectée prioritairement dans les astrocytes mais aussi dans les cellules endothéliales vasculaires. L'ApoC1 a également été retrouvée dans les plaques séniles au contact d'amyloïde β et d'ApoE (268).

Cette même équipe a montré que les souris transgéniques exprimant l'ApoC1 humaine présentaient une altération des fonctions de mémorisation et d'apprentissage en comparaison aux souris wild-type. Il n'a pas été retrouvé de différence significative dans le profil cérébral en stérols et en phospholipides, dans l'expression des gènes clés du métabolisme lipidique (HMG CoA réductase, LDL récepteur, ABCA1, ABCG1, ABCG4, LCAT, récepteur scavenger de classe B). Comme l'ApoC1 possède des capacités d'inhibition du métabolisme lipidique médié par l'ApoE (277,278), l'expression cérébrale et le taux cérébral d'apoE ont été mesurés. Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans les deux groupes. Le mécanisme de cette altération des fonctions cognitives reste donc inconnu.

Au vu de ces résultats, l'hypothèse a été émise qu'un déficit en ApoC1 s'accompagnait d'une amélioration des fonctions cognitives (344). Les fonctions cognitives de souris KO pour l'ApoC1 ont alors été comparée à celles de souris wild type. Il s'est avéré que les souris déficientes en ApoC1 présentaient de manière inattendue une altération des fonctions de mémorisation. Les souris KO pour l'ApoC1 et les souris témoins ne présentaient pas de différence de leurs taux cérébraux en cholestérol, en précurseur ou métabolites du cholestérol et des systèmes de transport du cholestérol. Il n'y avait également pas de différence des marqueurs de l'inflammation au niveau cérébral dans les deux populations (344). Il semble donc que cette altération des fonctions cognitives ne passe pas par une perturbation du métabolisme lipidique cérébral ou par un mécanisme inflammatoire. Cependant, il semble qu'une expression finement régulée de l'ApoC1 au niveau cérébral joue un rôle majeur dans les fonctions cognitives.

En somme, il existe un lien entre le polymorphisme de l'apoC1 et la maladie d'Alzheimer. Une diminution du taux d'expression de l'ARNm de l'apoC1 et une augmentation des taux d'apoC1 au niveau cérébral ont été observées chez des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer. Cependant, les résultats d'études avec des modèles murins exprimant l'apoC1 humaine ou déficiente en apoC1 sont contradictoires et n'apportent aucune

réponse sur le lien pouvant exister entre l'apoC1 et la maladie d'Alzheimer. Le rôle de l'apoC1 dans la maladie d'Alzheimer reste donc à définir.

8- ApoC1 et LPS

Le lipopolysaccharide (LPS) est un composant hautement inflammatoire situé dans la membrane externe des bactéries à gram négatif. Lorsque ces bactéries se multiplient ou se lysent, le LPS est libéré et active le complexe MD2-TLR4 (Protéine de différenciation myéloïde 2 et Récepteur Toll Like 4) des cellules endothéliales, des monocytes et des macrophages, ce qui entraîne une activation de la voie NFkB responsable d'effet pro-inflammatoires (345).

Le TLR4 joue un rôle important dans la défense immunitaire puisqu'il a été bien démontré que les souris déficientes en TLR4 présentaient une altération de leurs défenses immunitaires lors d'infections urinaires à *Escherichia Coli* (346), pulmonaires à *Klebsiella pneumoniae* (347,348), ORL à *Haemophilus influenzae* (349), abdominales à *Klebsiella pneumoniae* (349), à *Neisseria* (350) ou à *Salmonelle* (351).

L'activation de TLR4 entraîne la production de médiateurs pro-inflammatoires, comme le TNF- α . Ces médiateurs jouent un rôle majeur dans la défense immunitaire précoce contre les infections. La neutralisation de TNF- α aggrave la mortalité par sepsis chez les souris (352–354).

Une part importante des sepsis sont causés par des infections à bactéries à gram négatif. Le métabolisme des lipoprotéines joue un rôle important au cours des sepsis. Le LPS affecte les taux plasmatiques de lipoprotéines en modulant l'activité des enzymes lipolytiques et la liaison aux récepteurs des lipoprotéines (355). Les lipoprotéines peuvent se lier au LPS et moduler la réponse immunitaire au LPS (356,357). Il a également été démontré que des taux élevés de HDL améliorent la mortalité d'origine infectieuse (358–360). Les apolipoprotéines peuvent également avoir des effets de modulation du LPS. Il a ainsi été démontré que l'ApoE prévenait la production de cytokines induite par le LPS et protégeait contre la mortalité par infection chez le rongeur (361). Il a été démontré lors de sepsis que les HDL étaient déplétées en apoC1 (362), laissant penser que l'apoC1 jouait un rôle dans la réponse immunitaire au sepsis.

La première étude s'intéressant au rôle de l'ApoC1 dans la réponse aux infections a montré par analyse d'alignement de séquence que l'ApoC1 possédait un motif de liaison riche en lysine KVKEKLK dans son domaine C-terminal, présentant une forte homologie avec les motifs de liaison de 2 protéines connues pour se lier avec le LPS, le *facteur Limulus anti-LPS* (LALF) et le *peptide 18 cationique antimicrobien* (CAP-18)(363). L'apoC1 présente également de nombreuses alternances de motifs cationiques/hydrophobes, également retrouvés dans les régions de liaison de protéines se liant au LPS, comme la lactoferrine, l'apoE et le MD2 (364). Les études in vitro montrent une liaison forte entre l'apoC1 humaine et le LPS.

Il a également été démontré que l'apoC1 prolonge le temps de résidence du LPS au niveau sanguin en favorisant la liaison du LPS avec les HDL. Elle diminue également la captation du LPS par le foie et la rate. Ces 2 effets sont dose-dépendant. L'ApoC1 stimule la réponse inflammatoire induite par le LPS. En effet, une injection de LPS s'accompagne de taux plasmatiques de TNF- α 2 fois moins importants chez la souris déficiente en ApoC1 comparée à une souris WT. En revanche, les taux de TNF- α sont 7 fois supérieurs à ceux d'une souris WT chez les souris ApoC1 humaine. Suite à une infection par *Klebsiella pneumoniae*, les souris exprimant ApoC1 humaine présente des taux plasmatiques de TNF- α et E-selectine supérieurs à ceux des souris déficientes en ApoC1, alors que le nombre de bactéries est 25 fois moins important chez les souris exprimant l'ApoC1 humaine. De plus, le taux de survie est significativement amélioré en présence d'ApoC1 (53 vs 16%). L'ApoC1 semble donc faciliter la réponse immunitaire à une infection bactérienne à Gram négatif.

Il a donc été démontré que la liaison d'ApoC1 avec LPS était liée au motif riche en lysine à son extrémité C-terminale. Cependant le remplacement des résidus lysine par des résidus alanine même s'il entraîne une diminution de la capacité d'ApoC1 de se lier au LPS ne l'abroge pas complètement (364). De plus, ce mutant d'ApoC1 était capable de moduler in vivo la cinétique du LPS ce qui laisse penser que l'ApoC1 contient des éléments supplémentaires permettant la liaison d'ApoC1 au LPS. Des peptides dérivés des extrémités N et C-terminales de l'ApoC1 humaine ont alors été générés. Il a été montré que les peptides contenant l'ensemble de l'hélice N-terminale (ApoC1 1-30, ApoC1 1-38) ou de l'hélice C-terminale (ApoC1 35-57) de l'ApoC1 étaient également capables de se lier au LPS, mais aussi de prolonger le temps de résidence du LPS dans le plasma en diminuant son entrée au niveau hépatique et de favoriser la réponse inflammatoire induite par le LPS. Ces données confirment l'existence d'éléments additionnels intervenant dans la liaison de l'ApoC1 au LPS.

Les taux d'ApoC1 chez 70 personnes victimes d'un sepsis sévère, pendant 30 jours à partir de leur entrée en unité de soins intensifs ont été étudiés (365). L'ApoC1 était fortement diminuée (environ 5 fois) par rapport à sa valeur normale (6 mg/dl) chez ces patients avec sepsis. Le taux d'ApoC1 était significativement plus élevé chez les patients ayant survécus au sepsis en comparaison aux non survivants et ce même après ajustement pour le taux de lipides. Le taux d'ApoC1 retrouvait une valeur normale au cours du suivi chez les survivants alors qu'il restait bas chez les non survivants. L'ApoC1 plasmatique est donc corrélée à une augmentation de la survie chez des patients atteints de sepsis sévère.

Une autre étude menée chez l'homme a démontré qu'un taux plasmatique élevé d'ApoC1 était associé à une diminution de la mortalité (366). Elle concernait 561 sujets de 85 ans participant initialement à une étude prospective de suivi pour déterminer les facteurs d'un vieillissement réussi. Les taux plasmatiques d'ApoC1 à l'entrée dans l'étude ont été mesurés tout comme les taux de cholestérol total, de HDL-C, de LDL-C, de triglycérides et la CRP. Le taux moyen d'ApoC1 était de 6,68 mg/dl. 17% (n=48) des participants sont morts d'une infection. Les sujets avec un taux d'ApoC1 élevé (supérieur à la médiane) présentaient un risque cumulé de mortalité inférieur à celui des sujets avec une ApoC1 basse. Le risque de mortalité diminuait de 40% pour chaque augmentation d'une déviation standard de l'ApoC1. Le risque de mortalité diminuait de 35% pour chaque augmentation d'une déviation standard du taux de HDL-C. Il n'existait pas d'association entre la mortalité et les autres paramètres lipidiques et la CRP. En analyse multivariée, l'effet protecteur de l'ApoC1 sur la mortalité d'origine infectieuse persistait (0,63 ; 95%IC, 0,44-0,90, p=0,013), alors que l'effet protecteur du HDL-C n'était plus significatif. L'effet protecteur de l'ApoC1 est donc indépendant du HDL-C.

Enfin, il a été démontré qu'un taux élevé d'ApoC1 en préopératoire était associé à une majoration de la réponse pro-inflammatoire (évaluée par le dosage de TNF- α) chez des sujets victimes d'une endotoxémie lors d'une chirurgie cardiaque par pontage cardio-pulmonaire. Un lien plus faible a été retrouvé avec le cholestérol total, mais pas avec le taux de triglycérides ni le taux d'ApoC3. Le HDL-C et le LDL-C n'ont pas été évalués. Aucun lien n'a été retrouvé entre les taux d'ApoC1 et de TNF α en l'absence d'endotoxémie (367).

Il a été démontré que le TLR4 était exprimé dans les macrophages et les cellules endothéliales au sein des lésions d'athérosclérose (368,369). Les infections à chlamydia pneumoniae (bactérie à gram négatif) sont associées à une augmentation des maladies coronariennes chez l'homme (370–372). Chez le rongeur, l'injection de chlamydia pneumoniae dans la paroi vasculaire de l'artère carotide majeure le développement de

l'athérosclérose chez des souris déficientes en LDL-R (373). Des résultats similaires après injection de *chlamydia pneumoniae* sont retrouvés dans 3 autres études chez la souris (374–376). Nous avons vu que l'ApoC1 était liée au LPS et entraînait une augmentation de la réponse inflammatoire induite par le LPS chez la souris (363). Une étude (Westerterp 2007) a donc évalué l'effet de l'apoC1 endogène sur le développement de l'athérosclérose induite par le LPS chez des souris déficientes en ApoE, qui exprimaient l'apoC1 ou étaient déficientes en apoC1 (377). L'administration de LPS n'a pas affecté le volume de la plaque d'athérome chez les souris déficiente en apoC1. En revanche, l'expression d'apoC1 s'est accompagnée d'une augmentation du volume des lésions d'athérosclérose de 60%. Il a également été observé chez les souris exprimant l'ApoC1 une augmentation plus importante des taux plasmatiques de fibrinogène et de selectine-E, suite à l'injection de LPS. Il semble donc que l'ApoC1 majore l'état inflammatoire induit par le LPS au niveau systémique (fibrinogène) et au niveau de la paroi vasculaire (selectine-E). L'ApoC1 est donc impliquée fortement dans le développement de l'athérosclérose induite par le LPS chez des souris déficientes en ApoE.

En somme, l'apoC1 joue un rôle important dans les infections à gram négatif, responsable de la libération de LPS. L'apoC1 se lie au LPS et entraîne une diminution de sa captation hépatique et une augmentation de son temps de résidence plasmatique. En outre, l'apoC1 facilite la réponse inflammatoire induite par le LPS.

Ainsi, il a été démontré, chez l'homme, que des taux plasmatiques élevés d'apoC1 étaient associés à un taux de survie plus élevé en cas de sepsis sévère et à une diminution de la mortalité d'origine infectieuse au sein d'une population de sujets âgés.

9- ApoC1 et athérosclérose

L'athérosclérose se développe selon plusieurs processus interdépendants, à savoir des perturbations lipidiques, l'activation plaquettaire, la thrombose, la dysfonction endothéliale, le stress oxydatif, l'inflammation, l'activation des cellules lisses vasculaires et le remodelage vasculaire (378). Des études épidémiologiques ont montré que de nombreux facteurs de risque à la fois environnementaux et génétiques favorisaient le développement de l'athérosclérose (379). Il a ainsi été démontré dans plusieurs études que le risque de développer l'athérosclérose était lié pour 50% à une prédisposition génétique (380).

De nombreux gènes impliqués dans les lésions d'athérosclérose au niveau carotidien ont ainsi été identifiés, notamment le gène de l'apoC1. L'expression du gène de l'apoC1 a ainsi été comparée dans des lésions d'athérome de 10 sujets opérés pour endartériectomie carotidienne ou fémorale et sur des artères saines prélevées en post mortem (381). Les taux d'ARNm de l'apoC1 et d'apoC1 étaient plus élevés dans les lésions d'athérosclérose carotidiennes et fémorales.

Il a été démontré qu'une élévation postprandiale des triglycérides était fréquente chez les sujets coronariens normolipidiques (382). Ainsi, les perturbations du métabolisme lipidique, responsables d'une augmentation du risque cardio-vasculaire, peuvent être détectées de manière plus précoce en période postprandiale qu'en période de jeun. Certaines perturbations postprandiales du métabolisme lipidiques peuvent donc servir de marqueurs précoces du risque cardio-vasculaire. Même si une fraction significative des triglycérides postprandiaux est portée par les chylomicrons, la majeure partie des lipoprotéines riches en triglycérides qui s'accumulent dans le plasma après un repas sont des VLDL (383). De plus, il a été démontré que la composition en lipides et en apolipoprotéines des VLDL était modifiée en période postprandiale. La composition postprandiale des VLDL a donc été étudiée pour mieux comprendre la contribution de ces lipoprotéines à la pathogénèse de l'athérosclérose.

Il a été démontré, chez des sujets masculins coronariens et normolipidémiques, en situation postprandiale, que le contenu des VLDL en apoC1 était 50 à 100% supérieur à celui de sujets témoins normolipidémiques (384). En revanche, le contenu en apoC2 et apoC3 n'était pas modifié.

Le nombre et la composition des VLDL et des chylomicrons remnants en situation postprandiale ont été étudiés chez 30 hommes de 50 ans sans antécédent cardio-vasculaire, normolipidiques, avec ou sans lésions d'athérosclérose précoce (385). Les sujets porteurs de signes d'athérosclérose précoce (épaisseur intima-média de l'artère carotide commune) n'avaient pas d'élévation plus importante postprandiale du taux de triglycérides et de lipoprotéines riche en TG. En revanche, ces sujets avec augmentation de l'épaisseur intima-média (n=20) présentaient un enrichissement important en apoC1 de leur chylomicrons remnants et de leur VLDL, en comparaison aux sujets avec une épaisseur intima-media normale. Le nombre de molécule d'apoC1 sur les chylomicrons remnants était fortement associé au degré d'athérosclérose précoce. Le contenu en apoC1 des lipoprotéines restantes pourrait ainsi être un marqueur précoce du risque cardio-vasculaire.

Le lien entre l'enrichissement postprandial en apoC1 des lipoprotéines riches en TG, les facteurs de risques cardiovasculaires et l'athérosclérose précoce a été étudié chez 72 sujets sains, de sexe masculin, âgés de 50 ans (386). A jeun, l'épaisseur intima-média était corrélée positivement au taux de proinsuline, de cholestérol, de VLDL, de LDL et d'IDL. En période postprandiale, l'épaisseur intima-media était liée significativement au taux de triglycérides jusqu'à la 4^e heure, au taux de VLDL large à la 3^e heure, au taux plasmatique en apoC1, au taux en lipoprotéines riches en TG à la 6^e heure et au contenu en ApoC1 des lipo riche en TG à la 6^e heure. En analyse multivariée, l'épaisseur intima-média était associée de manière indépendante au contenu en ApoC1 des lipoprotéines riches en triglycérides à la sixième heure, au taux plasmatique de triglycérides à la deuxième heure et à la cholestérolémie à jeun. Le contenu postprandial en apoC1 des lipoprotéines riches en triglycérides semble alors être un facteur de risque indépendant d'athérosclérose précoce chez les hommes sains normolipidiques et d'âge moyen.

En partant du constat que l'apoC1 est exprimée essentiellement dans le foie, mais aussi dans les macrophages (254), que l'expression d'ApoC1 au niveau des macrophages pouvait affecter leur homéostasie lipidique (387) et que les macrophages étaient impliqués dans l'initiation et le développement des lésions d'athérosclérose in vivo (388), les effets de l'apoC1 systémique et de l'apoC1 des macrophages sur le développement de l'athérosclérose ont été étudiés (389).

Des souris déficientes en ApoE ont été utilisées pour se libérer des effets de l'ApoC1 qui pourraient être liés à l'ApoE et ont été comparées à des souris apoC1 +/+. L'expression de l'apoC1 s'est accompagnée d'une élévation du taux de TG de 70% et de cholestérol de 30%. Cette augmentation était essentiellement liée à une augmentation des TG et du cholestérol dans les VLDL. Les souris apoC1+/+ présentaient une augmentation des lésions d'athérosclérose de 87%. Le contenu en macrophages dans les lésions d'athérosclérose n'était pas différent entre les 2 populations de souris (389). Il a été démontré in vitro que l'ApoC1 humaine augmentait l'efflux de cholestérol des macrophages. Cependant, une transplantation de moelle osseuse de souris apoC1-/- ou apoC1+/+ a été réalisée chez des souris apoC1+/+ pour étudier l'effet de l'expression spécifique de l'ApoC1 des macrophages sur le développement de l'athérosclérose. Il n'a pas été retrouvé de différence des taux lipidiques et des lésions d'athérosclérose. Cette étude a donc montré que l'ApoC1 systémique aggravait l'athérosclérose, probablement par une hyperlipidémie et que l'ApoC1 des macrophages ne

jouait pas de rôle notable dans le développement de la plaque, malgré son effet d'augmentation de l'efflux de cholestérol des macrophages *in vitro* (389).

Notons également que deux études utilisant la spectrométrie de masse ont mis en évidence de nouvelles isoformes de l'apoC1 chez des patients coronariens comparés à des sujets sains. La première étude a étudié le spectre de masse de l'apoC1 dans les sous fractions HDL2 et HDL3 de 7 patients coronariens et 8 sujets contrôles sains (390). Il a été mis en évidence une isoforme de l'apoC1 ayant un poids supérieur de 90 Da à la forme connue de l'apoC1. De plus, la présence de pics satellites indique l'implication de processus oxydatifs. La deuxième étude, utilisant la technique du MALDI-TOF, a mis en évidence une forme oxydée de l'apoC1 chez tous les patients porteurs d'une maladie athéromateuse avancée (391).

En somme, il est retrouvé une augmentation des quantités d'apoC1 dans la paroi artérielle fémorale et carotidienne au niveau de lésions d'athérosclérose. En situation postprandiales, le contenu en apoC1 des lipoprotéines riches en triglycéride est augmenté et est associé à une augmentation de l'épaisseur intima-média, signe précoce d'athérosclérose. Dans des modèles animaux, l'expression de l'apoC1 s'accompagne d'une aggravation des lésions d'athérosclérose, sans que le mécanisme ne soit élucidé.

De nouvelles isoformes oxydées de l'apoC1 ont été mise en évidence chez des patients porteurs de lésions d'athérosclérose.

TRAVAUX DE THESE

I- Perte de la capacité d'inhibition de l'apoC1 chez des sujets coronarien hyperlipidémiques.

1- Introduction

Nous avons vu que la CETP assurait le transfert des esters de cholestérol entre les HDL et les lipoprotéines contenant l'apoB. Dans les études de cohorte, un taux élevé de LDL-C est facteur de risque de maladie cardio-vasculaire, alors qu'un taux élevé de HDL-C est un facteur protecteur de maladie cardio-vasculaire. Un intérêt particulier a été porté à l'inhibition de la CETP et ce d'autant plus qu'il a été démontré qu'une activité CETP élevée était associée à une accélération de la progression de l'athérosclérose et à une augmentation de l'incidence des maladies coronariennes. Des inhibiteurs pharmacologiques de la CETP ont été développés et étudiés en prévention secondaire cardio-vasculaire avec des résultats décevants pour l'instant. Cependant, ces inhibiteurs restent intéressants dans la mesure où la pertinence de leur efficacité n'a pas été déterminée dans des sous groupes de patients à haut risque cardio-vasculaire avec des profils lipoprotéiques différents.

Nous avons également démontré que l'apoC1 était un inhibiteur physiologique de la CETP.

L'impact de l'apoC1 à la fois sur l'activité CETP et sur le taux de HDL-C n'avait jamais été étudié dans une même population. De plus, les preuves d'une élévation des taux plasmatiques de HDL et du ratio HDL/LDL secondaire à l'effet inhibiteur de l'apoC1 sur la CETP n'ont jamais été apportées. En outre, la persistance du potentiel inhibiteur de l'apoC1 sur l'activité CETP chez les patients dyslipidémiques est inconnue. Ces éléments nous ont donc conduit à mener cette étude en collaboration avec l'équipe du Professeur Jacques Bonnet à Bordeaux.

L'objectif de cette étude était donc d'étudier la fonctionnalité de l'apoC1 en tant qu'inhibiteur de la CETP chez des sujets coronariens normolipidémiques et hyperlipidémiques et d'évaluer son impact sur la distribution en cholestérol entre les HDL et les lipoprotéines contenant l'apoB.

Constitutive inhibition of plasma CETP by apolipoprotein C1 is blunted in dyslipidemic patients with coronary artery disease[§]

Xavier Pillois,* Thomas Gautier,[†] Benjamin Bouillet,^{†,§} Jean-Paul Pais de Barros,[†] Aline Jeannin,[†] Bruno Vergès,^{†,§} Jacques Bonnet,^{*,**} and Laurent Lagrost^{1,†,§}

University Victor Segalen of Bordeaux II-INSERM Research Center UMR828,* Bordeaux, France; University of Bourgogne-INSERM Research Center UMR866,[†] Dijon, France; University Hospital of Dijon,[§] Dijon, France; University Hospital of Bordeaux,^{**} Bordeaux, France

Abstract Plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) promotes the cholesterol enrichment of apoB-containing lipoproteins (VLDL and LDL) at the expense of HDL. Recent studies demonstrated that apoC1 is a potent CETP inhibitor in plasma of healthy, normolipidemic subjects. Our goal was to establish whether the modulation of CETP activity by apoC1 is influenced by dyslipidemia in patients with documented coronary artery disease (CAD). In the total CAD population studied (n = 240), apoC1 levels correlated negatively with CETP activity, independently of apoE-epsilon, CETP-Taq1B, and apoC1-Hpa1 genotypes. In multivariate analysis, the negative relationship was observed only in normolipidemic patients, not in those with hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, or combined hyperlipidemia. In the normolipidemic subjects, apoC1 levels were positively associated with higher HDL- to LDL-cholesterol ratio ($r = 0.359$, $P < 0.001$).[¶] It is concluded that apoC1 as a CETP inhibitor no longer operates on cholesterol redistribution in high-risk patients with dyslipidemia, probably due to increasing amounts of VLDL-bound apoC1, which is inactive as a CETP inhibitor. Patients with dyslipidemia could experience major benefits from treatment with pharmacological CETP inhibitors, which might compensate for blunted endogenous inhibition.—Pillois, X., T. Gautier, B. Bouillet, J.-P. Pais de Barros, A. Jeannin, B. Vergès, J. Bonnet, and L. Lagrost. Constitutive inhibition of plasma CETP by apolipoprotein C1 is blunted in dyslipidemic patients with coronary artery disease. *J. Lipid Res.* 2012. 53: 1200–1209.

Supplementary key words cholesteryl ester transfer protein • dyslipidemia • hypercholesterolemia • hypertriglyceridemia • combined hyperlipidemia • lipoproteins • metabolism

This work was supported by grants from the Université de Bourgogne, the Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, the Conseil Régional de Bourgogne, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Agence Nationale de la Recherche (ANR)-AtheroLip Project, and the Fondation de France.

Manuscript received 25 November 2011 and in revised form 19 March 2012.

Published, JLR Papers in Press, April 2, 2012
DOI 10.1194/jlr.M022988

Large cohort studies have indicated that the risk for cardiovascular disease correlates positively with the cholesterol content of apoB-containing lipoproteins (VLDL and LDL) but negatively with the cholesterol content of HDL (1). Thus, interest in intervention strategies that lead not only to a significant reduction in LDL-cholesterol (LDL-C) but also to a concomitant increase in HDL-cholesterol (HDL-C) has grown in recent years. In this context, particular attention has been paid to the inhibition of cholesteryl ester transfer protein (CETP) because this factor promotes the cholesterol enrichment of apoB-containing lipoproteins at the expense of HDL (2). High CETP activity was found to accelerate the progression of atherosclerosis and to increase the incidence of coronary artery disease (3–6). Recent intervention trials of secondary prevention in high-risk patients confirmed that pharmacological inhibition of CETP leads to a marked, unrivalled rise in the HDL-C to LDL-C ratio (7–9). Although the outcome of the ILLUMINATE study was negative, probably because of an off-site target effect of the CETP inhibitor torcetrapib, treatments with anacetrapib in the DEFINE study (9) and dalcetrapib in the dal-PLAQUE study (10) did not result in adverse cardiovascular effects. Thus, prevention of cardiovascular disease with pharmacological CETP inhibitors is still worthwhile to pursue, and whether CETP inhibition might be equally relevant in subgroups of high-risk patients with distinct lipoprotein profiles remains an unanswered question.

Unlike apoB-containing lipoproteins, HDL was found in earlier studies to inhibit CETP activity in a concentration-dependent manner (11). In subsequent studies, and among

Abbreviations: BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; CETP, cholesteryl ester transfer protein; HDL-C, HDL-cholesterol; LDL-C, LDL-cholesterol; MI, myocardial infarction; NSTEMI, non-STEMI; STEMI, ST segment elevation myocardial infarction; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; TRL, TG-rich lipoprotein.

¹To whom correspondence should be addressed.

e-mail: laurent.lagrost@u-bourgogne.fr

[§]The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains supplementary data in the form of one table.

Copyright © 2012 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

all the apolipoprotein components of HDL, apoC1 arose as a potent inhibitor of CETP in vitro (12). Besides apoC1, apoF was described as a potent CETP inhibitor in vitro (13). However, unlike the lipid transfer inhibitory activity of apoC1 that is associated with the plasma HDL fraction (12), apoF exerts its effect almost exclusively when localized in LDL (13). The human apoC1 inhibitor operates through the modification of the HDL electrostatic charge, which is recognized as a major determinant of the CETP-lipoprotein interaction and, consequently, of the uptake and exchange of core neutral lipids (14, 15). Studies in apoC1-knocked out/human CETP transgenic (apoC1KO/HuCETPTg) and human apoC1 transgenic/human CETP transgenic (HuapoC1Tg/HuCETPTg) mice provide direct support to earlier in vitro observations with purified human apoC1 (16, 17).

In humans, no cases of isolated apoC1 deficiency have been reported. In normolipidemic, healthy subjects, plasma apoC1 concentration was reported to correlate negatively with cholesteryl ester transfer activity on the one hand (15), and positively with HDL-C concentration on the other hand (18, 19). However, the impact of apoC1 on both CETP activity and HDL levels was not addressed simultaneously in one given population, and thus evidence for increased HDL-C levels, as well as increased HDL-C to LDL-C ratio because of the apoC1-mediated blockade of CETP activity remains to be brought. Most importantly, whether apoC1 still exerts a potent inhibitory effect on CETP in dyslipidemic patients is unknown.

The aim of the present study was to address the functionality of plasma apoC1 as a CETP inhibitor in normo- and dyslipidemic patients with documented coronary artery disease (CAD) and to determine the consequences in terms of cholesterol distribution between HDL and apoB-containing lipoproteins.

METHODS

Study design and patients

Two hundred and forty consecutive patients of Caucasian origin underwent a diagnostic cardiac catheterization from September 2006 to January 2008 at the Cardiology Unit in Bordeaux University Hospital for the indication of acute myocardial infarction or stable coronary artery disease. Included patients were found to have at least one significant coronary lesion $\geq 50\%$ on angiography. Myocardial infarction was defined on the basis of a troponin I level ≥ 0.02 ng/ml and ST segment elevation myocardial infarction (STEMI) or non-STEMI (NSTEMI) electrocardiographic changes. The severity of the CAD was recorded on computerized angiographic data forms. Patients with documented diabetes were excluded. Included patients were of unrestricted age and gender and gave written informed consent for blood samples to be used in a confidential "deoxyribonucleic bank," complying with the Declaration of Helsinki and approved by the local Research Ethics Committee. Baseline characteristics, including age, gender, clinical presentation, and initial cardiac catheterization results, were collected prospectively. Fasting blood samples and clinical parameters were obtained 3 months after inclusion. All of the CAD patients were under statin therapy

for at least 3 months. Some patients were treated for hypertension, and all of them received lifestyle recommendations (including smoking and alcohol cessation, lipid-poor diet, and increase in walking activity). Lipoprotein profile remained stable after the initial, first month of treatment.

Hypertension was defined on the basis of a systolic blood pressure of 140 mmHg or higher, and/or a diastolic blood pressure of 90 mmHg or higher, or a history of hypertension requiring treatment (20). Body mass index was calculated by body weight in kilograms divided by the square of height in meters. At 3 months of follow-up, some patients were normolipidemic because of their initial normal lipid profile or the statin treatment. Definition of dyslipidemia was determined 3 months after initiation of statin treatment. Hypercholesterolemia was defined as plasma LDL-C level higher than 2.6 mmol/l; hypertriglyceridemia was defined as a plasma triglyceride (TG) level higher than 1.7 mmol/l; and combined hyperlipidemia was defined as a plasma LDL-C level higher than 2.6 mmol/l and a plasma TG level higher than 1.7 mmol/l (21).

ApoC1 distribution studies in a population of healthy subjects

For mechanistic insights and apoC1 distribution studies, an independent group of 23 healthy subjects was recruited (main characteristics are shown in supplementary Table 1). VLDL were isolated by a 90 min, 100,000 rpm ultracentrifugation at $d = 1.006$ in a TLA.100 rotor in a TLX ultracentrifuge (Beckman, Palo Alto, CA). Supernatants contained VLDL and infranatants contained IDL, LDL, and HDL. Both fractions were subsequently subjected to apoC1 quantitation (see below).

Plasma and DNA preparation

EDTA anticoagulated blood samples were centrifuged for serum separation within the hour of collection. Plasmas were aliquoted and stored at -80°C until their analysis. DNA was extracted from 200 μl buffy coat of a centrifuged EDTA anticoagulated blood sample, with a QiaAmp@DNA minikit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol.

Lipids, lipoproteins, and apolipoprotein C1

Total serum cholesterol (TC), TG, and HDL-C levels were determined using enzymatic assay kits (Roche modular, Roche Diagnostics SA, France). LDL-C was calculated by the Friedewald equation when TG were below 5.7 mmol/l, and it was quantitated by a direct assay from Beckman coulter (OSR6183 kit) when TG were above 5.7 mmol/l. ApoC1 was quantitated in total plasma and in lipoprotein fractions by a specific ELISA using an anti-human apoC1 antiserum from rabbit (22).

Gene polymorphism genotyping

CETP, apoE, and apoC1 genotyping was performed by a restriction fragment length polymorphism (RFLP)-based method as previously described (23–26). Briefly, polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed using the following primers: *i*) surrounding the *TaqIB* polymorphism in intron 1 of the CETP gene: 5'-CAC ACC ACT GCC TGA TAA CC-3' (forward) and 5'-GTG ACC CCC AAC ACC AAA TA-3' (reverse); *ii*) surrounding the *HpaI* polymorphism in the promoter of the ApoC1 gene: 5'-ATC GAT CAC GAC CCT CTC-3' (forward) and 5'-TCC CCC ACT CAG AAT GTA-3' (reverse); and *iii*) in the exon 4 of the ApoE gene: 5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3' (forward) and 5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3' (reverse). The amplification mixture included 25 pmol of each primer, 100 ng genomic DNA, 1 \times GoTaq@ reaction

TABLE 1. Characteristics of total population (n = 240) and of normolipidemic patients and dyslipidemic subgroups

	Total (n = 240)	Normolipidemia (n = 101)	Hyperchol- esterolemia (n = 63)	Hypertrig- lyceridemia (n = 34)	Combined Hy- perlipidemia (n = 42)
Age (yr)	53.13 ± 10.79	54.17 ± 10.73	53.78 ± 9.05	51.91 ± 13.11	50.61 ± 11.17
Gender M [n (%)]	209 (87)	91 (90)	50 (79)	30 (88)	39 (93)
BMI	27.38 ± 4.4	26.59 ± 3.74	27.47 ± 4.82	29.01 ± 5.11 ^c	27.9 ± 4.38
HypoHDLemia [n (%)]	69 (29)	26 (26)	14 (22)	17 (50) ^{b,c}	12 (29)
Hypertension [n (%)]	72 (30)	35 (35)	19 (30)	12 (35)	6 (14) ^{c,b}
Current smoker [n (%)]	157 (65)	63 (62)	41 (65)	24 (71)	29(69)
MI [n(%)]	221 (92)	95 (94)	58 (92)	31 (91)	37 (88) ^c
Aspirin [n (%)]	161 (67)	69 (68)	41 (65)	22 (65)	29 (69)
β-blocker [n (%)]	77 (32)	29 (29)	21 (33)	12 (35)	15 (36)
ACE inhibitor or ARAII [n (%)]	58 (24)	26 (26)	15 (24)	8 (24)	9 (21)
Statin [n (%)]	240 (100)	101 (100)	63 (100)	34 (100)	42 (100)
Glycemia (mmol/l)	5.45 ± 0.73	5.36 ± 0.63	5.34 ± 0.69 ^a	5.69 ± 1.01 ^{b,d}	5.63 ± 0.71 ^{a,d,g}
Total cholesterol (mmol/l)	4.49 ± 1.07	3.75 ± 0.67	5.06 ± 0.91 ^a	4.16 ± 0.63 ^{a,c}	5.68 ± 0.83 ^{a,d}
Triglycerides (mmol/l)	1.83 ± 2.06	1.09 ± 0.32	1.27 ± 0.32	2.95 ± 2.79 ^{a,c}	3.58 ± 3.53 ^b
HDL-C (mmol/l)	1.29 ± 0.37	1.36 ± 0.44	1.31 ± 0.3 ^a	1.11 ± 0.27 ^d	1.24 ± 0.25 ^{a,g}
LDL-C (mmol/l)	2.59 ± 0.85	1.98 ± 0.41	3.31 ± 0.62 ^a	2.09 ± 0.4 ^{a,d}	3.42 ± 0.67 ^{a,g}
HDL-C/LDL-C ratio	0.55 ± 0.25	0.71 ± 0.27	0.4 ± 0.1 ^a	0.54 ± 0.15 ^e	0.37 ± 0.1 ^f
CETP mass (mg/l)	2.76 ± 0.76	2.55 ± 0.63	3.15 ± 0.84 ^a	2.61 ± 0.71 ^b	2.82 ± 0.75 ^a
CETP activity (nmol ³ H-CE/mg/h)	0.7 ± 0.33	0.61 ± 0.32	0.72 ± 0.32	0.8 ± 0.32	0.82 ± 0.33 ^c
ApoC1 mass (mg/l)	51.92 ± 14.64	49.84 ± 13.1	50.85 ± 16.69	55.09 ± 13.49	56.07 ± 15.01
CETP <i>TaqIb</i> [n (%)]					
B1B1	89 (37)	44 (44)	19 (30)	11 (32)	15 (36)
B1B2	121 (50)	48 (48)	33 (52)	18 (53)	22 (52)
B2B2	30 (13)	9 (9)	11 (17)	5 (15)	5 (12)
ApoC1 <i>HpaI</i> [n (%)]					
H1H1	170 (71)	71 (70)	45 (71)	23 (68)	31 (74)
H1H2	66 (28)	29 (29)	17 (27)	10 (29)	10 (24)
H2H2	4 (2)	1 (1)	1 (2)	1 (3)	1 (2)
ApoE [n (%)]					
E3E3	155 (65)	57 (57)	45 (73) ^c	23 (70)	30 (71)
E4E3 + E4E4	48 (20)	26 (26)	10 (16)	6 (18)	6 (14)
E2E3 + E2E2	34 (14)	17 (17)	7 (11)	4 (12)	6 (14)

Otherwise specified, values are mean ± SD.

^{a,b,c} Significantly different from normolipidemia, $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively.

^{d,e,f} Significantly different from hypercholesterolemia, $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively.

^{g,h} Significantly different from hypertriglyceridemia, $P < 0.05$, and $P < 0.001$, respectively.

buffer, 1.5 mmol/l MgCl₂, 0.2 mmol/l of each dNTP, and 0.5 U of GoTaq® DNA Polymerase in a total volume of 25 µl (Promega Corporation, Madison, WI). Amplification was performed for 40 cycles of 30 s at 95°C, 15 s at 60°C, and 15 s at 72°C with an initial denaturation period of 5 min at 95°C. About 20 µl of PCR product was digested with 2 U of the restriction enzyme *TaqI* for CETP gene polymorphism, *HpaI* for ApoC1 gene polymorphism, and *HhaI* for ApoE gene polymorphism according to the recommendations of the supplier (Fermentas, Life Sciences). Fragments obtained for CETP and ApoC1 genes polymorphism, were separated on a 2% MP agarose gel (Boehringer Mannheim, Germany) and stained with ethidium bromide. For ApoE gene polymorphism analysis, fragments were separated on an 8% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. One fragment of 505 bp indicated the absence of the *TaqI* restriction site in the CETP gene fragment (*B2B2* genotype), two fragments of 415 and 90 bp indicated the presence of the restriction site (*B1B1*), and three fragments of 505, 415, and 90 bp indicated heterozygosity for the restriction site (*B1B2*). Presence of site restriction for *HpaI* enzyme corresponds to H2 allele and results in two migratory species (58 and 137 bp) in homozygous form (H2H2) or in three fragments (58, 137, and 195 bp) in heterozygous form (H1H2). Absence on the two alleles of the restriction site results in one migratory

fragments of 195 bp (H1H1). Six potent restriction sites are present on the ApoE gene fragments, of which two are polymorphic, resulting in three distinct alleles. Presence of a migratory fragment of 83 bp corresponds to the E2 allele; a fragment of 72 bp corresponds to the E4 allele, and copresence of the two migratory species of 48 and 91 bp corresponds to the E3 allele.

CETP activity

The cholesteryl ester transfer rate in individual plasma samples was the measured transfer from [³H]cholesteryl ester-containing HDL toward endogenous apoB-containing lipoproteins (6). CETP mass concentration was measured by a specific ELISA with TP1 anti-CETP antibodies (27). CETP activity values were calculated as the ratio of the plasma cholesteryl ester transfer rate to the plasma CETP mass concentration, and it was expressed as nanomoles of ³H-CE transferred per milligram of CETP per hour.

Statistics

Data are shown as mean ± SD or percentage as indicated. Differences between groups were evaluated by the unpaired *t*-test for continuous variables and by the chi-square test for categorical variables. Relationships between CETP activity and apoC1

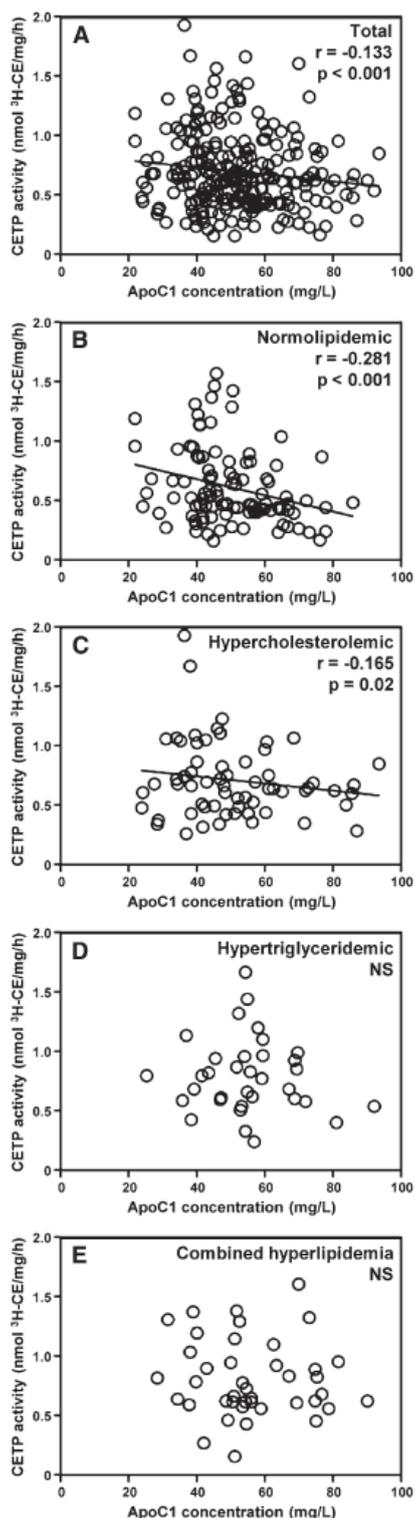


Fig. 1. Relationship between apolipoprotein C1 concentration and CETP activity in (A) total patients with coronary stenosis ($n = 240$)

concentration were analyzed by linear or multivariate linear regression analysis, with body mass index (BMI) as covariate. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Plasma apoC1 concentration correlated with CETP activity among patients with coronary stenosis

As indicated in Table 1, the mean age of the study population was 53.1 ± 10.8 years, and 87% were male patients. Twenty-six percent of the patients presented with hypercholesterolemia, 14% with hypertriglyceridemia, 17% with combined hyperlipidemia, and 30% with hypertension; 65% were smokers. One hundred and thirty nine patients (58%) were considered dyslipidemic, *i.e.*, presented with hypercholesterolemia, combined hyperlipidemia, or hypertriglyceridemia. Two hundred and twenty-one patients (92%) presented with myocardial infarction.

In a first attempt to assess the relationship between apoC1 and CETP activity, apoC1 concentration and CETP activity levels were determined in plasma from 240 consecutive patients with documented CAD. As shown in Fig. 1A, a significant, negative correlation was observed between plasma apoC1 concentration and CETP activity in CAD patients ($r = -0.133$, $P < 0.001$; $n = 240$), although the relationship was weaker than that reported earlier by the same authors using the same experimental design in healthy, normolipidemic controls (15). In multivariate regression analysis with BMI and common variants that may have influenced CETP activity, plasma lipid levels, and/or apoC1 concentration (including Epsilon gene polymorphism for apoE, TaqIB for CETP, and HpaI for apoC1), again apoC1 concentration was found to contribute significantly to CETP activity in the whole CAD population studied ($P = 0.031$; Table 2).

Dyslipidemia abrogates the ability of plasma apoC1 to modulate the CETP-mediated lipid transfer reaction in patients with CAD

Patients were classified into four groups according to their LDL-C and TG levels. Patients of the normolipidemic group had LDL-C levels and TG levels below 2.6 mmol/l and 1.7 mmol/l, respectively. Other patients presented with hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, or combined hyperlipidemia. As shown in Table 1, no significant differences in medication use were observed between the normolipidemic and dyslipidemic subgroups, in particular with all patients being treated with statins for at least 3 months. As shown in Fig. 1B, correlation analysis revealed a strong, significant, negative correlation between plasma apoC1 and CETP activity in the normolipidemic group ($r = -0.281$, $P < 0.001$). A weaker, however significant,

and in (B) normolipidemic patients ($n = 101$), and in patients presenting with (C) hypercholesterolemia (LDL-C levels above 2.6 mmol/l; $n = 63$), (D) hypertriglyceridemia (TG levels above 1.7 mmol/l; $n = 34$), or (E) combined hyperlipidemia (LDL-C and TG levels above 2.6 mmol/l and 1.7 mmol/l, respectively; $n = 42$). Correlation coefficients were calculated by linear regression analysis.

TABLE 2. Analyses of contributing factors for CETP activity and HDL-cholesterol level

	CETP Activity (nmol ³ H-CE/mg/h)		HDL-C (mmol/l)	
	$\beta \pm SE$	<i>P</i>	$\beta \pm SE$	<i>P</i>
Total (n = 240)				
ApoE-epsilon	0.0804 ± 0.0419	0.056	-0.0221 ± 0.0413	0.593
CETP-Taqlb	-0.0237 ± 0.0317	0.455	-0.0039 ± 0.0348	0.910
ApoC1-Hpa1	-0.0458 ± 0.0426	0.284	-0.0405 ± 0.0468	0.388
BMI	0.0055 ± 0.0048	0.250	-0.018 ± 0.0053	0.001
ApoC1 mass	-0.0031 ± 0.0014	0.031	0.0037 ± 0.0016	0.020
Normolipidemia (n = 101)				
ApoE-epsilon	0.0927 ± 0.0509	0.070	-0.035 ± 0.0684	0.605
CETP-Taqlb	-0.0154 ± 0.0493	0.754	-0.0008 ± 0.0663	0.990
ApoC1-Hpa1	-0.04 ± 0.0684	0.555	-0.1325 ± 0.092	0.151
BMI	-0.0093 ± 0.0086	0.281	-0.0225 ± 0.0116	0.053
ApoC1 mass	-0.0078 ± 0.0024	0.002	0.009 ± 0.0033	0.007
Hypercholesterolemia (n = 63)				
ApoE-epsilon	0.0764 ± 0.0744	0.307	0.0321 ± 0.0713	0.653
CETP-Taqlb	-0.0146 ± 0.0577	0.801	-0.068 ± 0.0553	0.222
ApoC1-Hpa1	-0.0969 ± 0.0787	0.221	0.0233 ± 0.0754	0.758
BMI	0.0114 ± 0.0082	0.170	-0.0097 ± 0.0079	0.223
ApoC1 mass	-0.0029 ± 0.0023	0.214	0.0037 ± 0.0022	0.102
Hypertriglyceridemia (n = 34)				
ApoE-epsilon	-0.02 ± 0.1348	0.883	0.0549 ± 0.1117	0.624
CETP-Taqlb	-0.0221 ± 0.0936	0.814	-0.1162 ± 0.0776	0.138
ApoC1-Hpa1	0.0243 ± 0.1101	0.826	0.0687 ± 0.0913	0.453
BMI	-0.004 ± 0.0119	0.740	-0.0073 ± 0.0099	0.461
ApoC1 mass	-0.0023 ± 0.0045	0.604	0.0023 ± 0.0037	0.539
Combined hyperlipidemia (n = 42)				
ApoE-epsilon	0.0181 ± 0.1051	0.864	-0.0466 ± 0.0805	0.564
CETP-Taqlb	-0.0359 ± 0.0856	0.676	0.0579 ± 0.0656	0.380
ApoC1-Hpa1	0.0617 ± 0.1129	0.586	-0.0038 ± 0.0865	0.965
BMI	0.0108 ± 0.0142	0.449	-0.0158 ± 0.0108	0.149
ApoC1 mass	0.0002 ± 0.0041	0.955	-0.0022 ± 0.0031	0.481

Multiple linear regression analysis was performed. The dependent variable was CETP activity or HDL-C level. Genotypes were encoded as ordinal variables: for apoE-epsilon genotypes, E2E2 + E2E3 = 3, E3E3 = 2, E4E4 + E4E3 = 1; for ApoC1 Hpa1 genotypes, H1H1 = 3, H1H2 = 2, H2H2 = 1; and for CETP Taq1B genotypes, B1B1 = 3, B1B2 = 2, B2B2 = 1. Statistically significant relationships are presented with bold values.

relationship was also observed in the hypercholesterolemic group ($r = -0.165$, $P = 0.02$; Fig. 1C), whereas no significant relationship between apoC1 and CETP activity was observed in the groups with hypertriglyceridemia or combined hyperlipidemia (Fig. 1D, E). A significant impact of hypertriglyceridemia in blunting the inhibitory property of apoC1 on plasma CETP activity was evidenced by diagonal stratification according to apoC1 levels on the two sides of the 50.6 mg/l median value. Indeed, and as shown in Fig. 2, high apoC1 concentration was associated with a significantly reduced CETP activity in the normolipidemic subgroup (-28.6% in "high apoC1" versus "low apoC1" subjects; $P < 0.001$) and, to a lesser extent, in the hypercholesterolemic subgroup (-19.2% in "high apoC1" versus "low apoC1" patients; $P = 0.045$). In subgroups of patients with isolated hypertriglyceridemia or combined hyperlipidemia, similarly elevated plasma cholesteryl ester transfer rates were observed whether the apoC1 level was in the high or the low range. In fact, a blunting effect on the inhibitory property of plasma apoC1 was observed with all the dyslipidemic states when common variants of apoE, CETP, and apoC1 genes were included in the analysis (Table 2). Overall, these observations support the ability of apoC1 to modulate CETP activity in plasma, however, only in normolipidemic, not in dyslipidemic, patients. In a

complementary investigation of healthy subjects (supplementary Table 1), plasma TG levels were positively correlated with apoC1-associated VLDL [inactive as CETP inhibitor (22)] levels, but not with total apoC1 levels, suggesting that entrapment of apoC1 in VLDL may contribute to the blunting of the constitutive inhibition of CETP activity in dyslipidemia (Fig. 3).

A beneficial impact of plasma apoC1 levels on the cholesterol distribution between HDL and LDL was found only in the subgroup of normolipidemic patients

As shown in Fig. 4A, a significant positive correlation between apoC1 and HDL-C levels was observed in the total population ($r = 0.165$, $P < 0.001$). This correlation was even stronger in the normolipidemic patients ($r = 0.330$, $P < 0.001$; Fig. 4B). A weaker, but still significant, correlation was observed in hypercholesterolemic patients ($r = 0.18$, $P < 0.001$; Fig. 4C); however in comparison with the normolipidemic individuals, no correlation was observed between plasma apoC1 levels and the HDL-C to LDL-C ratio (Table 2). Plasma apoC1 levels were associated neither with HDL-C levels nor with the HDL-C to LDL-C ratio in patients with hypertriglyceridemia or combined hyperlipidemia, and it was associated positively, not negatively with LDL-C in all dyslipidemic subgroups (Fig. 4C, D and

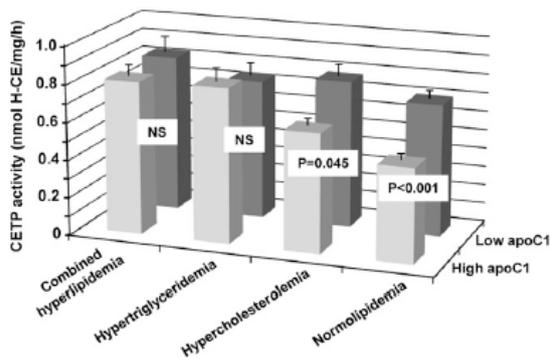


Fig. 2. Diagonal stratification of CETP activity according to apoC1 and the presence or the absence of dyslipidemia. Subgroups were constituted by distinguishing between patients with normolipidemia (LDL-C and TG levels below 2.6 mmol/l and 1.7 mmol/l, respectively; $n = 101$), hypercholesterolemia (LDL-C levels above 2.6 mmol/l; $n = 63$), hypertriglyceridemia (TG levels above 1.7 mmol/l; $n = 34$), or combined hyperlipidemia (LDL-C and TG levels respectively above 2.6 mmol/l and 1.7 mmol/l; $n = 42$). Low and high levels of apoC1 mass were on both sides of the median value (50.6 mg/l). Vertical bars show mean \pm SEM. Mean differences between low and high apoC1 groups were tested by unpaired *t*-test.

Table 3). This finding might reflect, in part, the previously reported liver X receptor (LXR)-dependent upregulation of apoC1 gene expression in the presence of increasing amounts of cholesterol in apoB-containing lipoproteins (28).

In multivariate analysis, including Epsilon gene polymorphism for apoE, Taq1B for CETP, and Hpa1 for apoC1, a significant contribution of apoC1 to HDL-C levels was observed in the normolipidemic subgroup only (Table 2).

Plasma lipid values and CETP parameters were compared in subgroups of patients with low versus high apoC1 concentrations on the two sides of the 50.6 mg/l median value (Table 4). In the total population, there was no difference between the high and low apoC1 concentration subgroups with regard to CETP mass concentration, but CETP activity was lower in patients with supramedian ("above") apoC1 concentration compared with patients with inframedian ("below") apoC1 concentration (0.66 ± 0.30 versus 0.74 ± 0.35 nmol 3 H-CE/mg/h, respectively; $P < 0.05$; Table 4). Higher HDL-C levels mostly accounted for the higher total cholesterol levels in patients with high apoC1 levels. Among normolipidemic patients, lower CETP

activity (-28.1% ; $P < 0.001$), higher HDL-C ($+20.7\%$; $P < 0.05$), and higher HDL-C to LDL-C ratio ($+26.3\%$; $P < 0.05$) were observed with apoC1 concentration above the median value. These differences in plasma lipoprotein parameters and cholesterol distribution in normolipidemic patients occurred in the absence of differences in total plasma cholesterol, triglycerides, and CETP mass concentration (Table 4). Among hypercholesterolemic patients, higher total cholesterol levels ($+13.0\%$; $P < 0.05$), lower CETP activity (-19.0% ; $P < 0.05$), and no significant difference in HDL-C and in the HDL-C to LDL-C ratio were observed in the high apoC1 subgroup. Among patients with hypertriglyceridemia or combined hyperlipidemia, no significant differences in CETP activity or in the lipoprotein distribution of cholesterol were observed when comparing patients with supramedian versus inframedian plasma apoC1 concentration (Table 4).

DISCUSSION

Apolipoprotein C1 is a small, basic apolipoprotein that is mainly produced by the liver. It is known to enter the bloodstream as a component of TG-rich lipoproteins (TRL) (29). TRL-bound apoC1 was found to inhibit lipoprotein lipase-mediated triglyceride hydrolysis and to impair recognition of apoC1-containing TRL by cellular receptors (30, 31). In vivo studies in animal models, which showed delayed catabolism of TRL in transgenic mice overexpressing human apoC1 (32, 33), have supported earlier in vitro observations. In the present study involving patients with documented CAD, no significant differences in plasma TG levels were observed whether apoC1 concentration was in the low range (below the 50.6 mg/l median value) or in the high range (above the 50.6 mg/l median value; Table 3). Whereas the blockade of TRL clearance by apoC1 was found to have pathophysiological relevance in hypertriglyceridemic mouse models (30, 33) and in some human populations (34), we found no direct support of the latter in the high-risk patients studied here. Interestingly, in a previous study (35), the apoC1 content of TRL was not a predictor of postprandial concentration of triglycerides in middle-aged men with early atherosclerosis.

Importantly, apoC1, a highly exchangeable apolipoprotein, is known to dissociate from TRL during its intravascular transport to rapidly associate with HDL, which is the

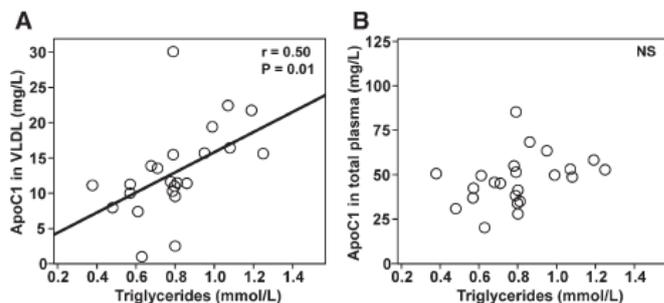


Fig. 3. Relationship between apoC1 levels in VLDL (A) and in total plasma (B) and plasma TG levels in a group of healthy subjects. VLDL was isolated by sequential ultracentrifugation as described in Materials and Methods. Apolipoprotein C1 concentrations in total plasma and in VLDL fractions were determined by a specific ELISA as described in Materials and Methods. Characteristics of healthy subjects are shown in supplementary Table I. Correlation coefficients were calculated by linear regression analysis. Correlation between total apoC1 and VLDL-apoC1: $r = 0.78$, $P < 0.0001$.

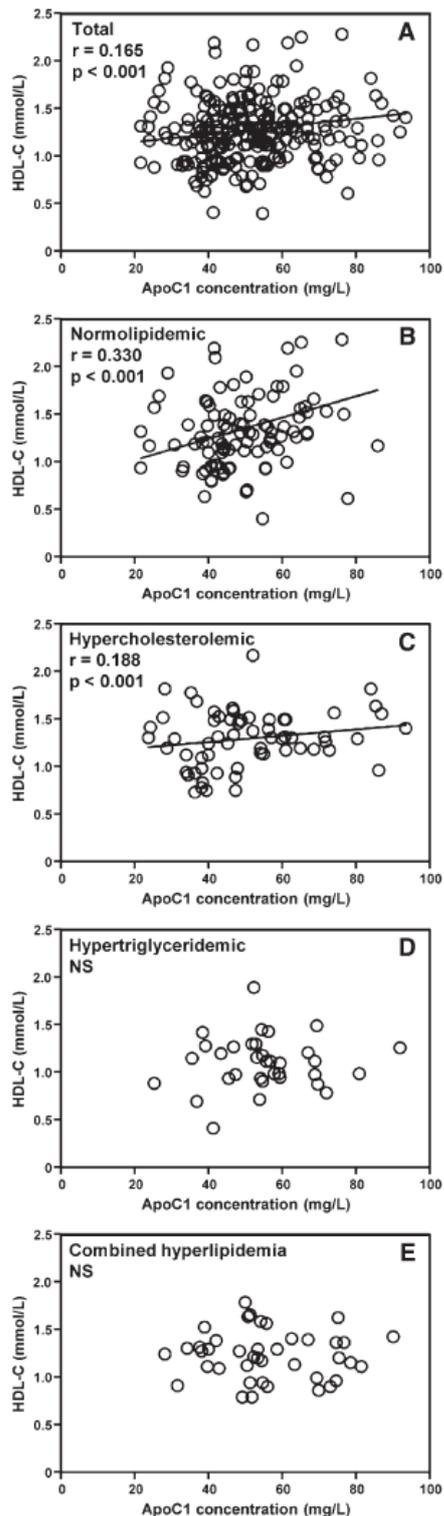


TABLE 3. Correlations between plasma apoC1 concentration and total plasma cholesterol, LDL-C, HDL-C, and HDL-C/LDL-C ratio in normolipidemic and in dyslipidemic subgroups

	ApoC1 Mass (mg/l)	
	r	P
Normolipidemia (n = 101)		
Total cholesterol (mmol/l)	0.107	0.255
LDL-C (mmol/l)	-0.131	0.004
HDL-C (mmol/l)	0.330	<0.001
HDL-C/LDL-C ratio	0.359	<0.001
Hypercholesterolemia (n = 63)		
Total cholesterol (mmol/l)	0.291	<0.001
LDL-C (mmol/l)	0.201	<0.001
HDL-C (mmol/l)	0.188	<0.001
HDL-C/LDL-C ratio	0.051	1.000
Hypertriglyceridemia (n = 34)		
Total cholesterol (mmol/l)	0.204	0.182
LDL-C (mmol/l)	0.248	0.020
HDL-C (mmol/l)	0.078	1.000
HDL-C/LDL-C ratio	-0.144	0.864
Combined hyperlipidemia (n = 42)		
Total cholesterol (mmol/l)	0.203	0.054
LDL-C (mmol/l)	0.249	0.002
HDL-C (mmol/l)	-0.027	1.000
HDL-C/LDL-C ratio	-0.187	0.145

Statistically significant relationships are presented with bold values.

main carrier of apoC1 in normolipidemic plasma (29). HDL-bound apoC1 is a potent inhibitor of CETP activity (22), which has been shown to be a strong, negative predictor of HDL-C levels in several human cohorts (18, 19). The ability of apoC1 to decrease specific CETP activity and, as a consequence, to reduce the net mass transfer of cholesteryl esters from HDL toward VLDL and LDL has been documented earlier in HuCETPTg/apoC1-KO mice [with higher specific CETP activity (16)] and in HuCETPTg/HuapoC1Tg mice [with lower specific CETP activity (17)] when compared with HuCETPTg counterparts. More recently, a negative correlation between plasma concentrations of apoC1 and levels of CETP activity was reported in healthy, normolipidemic subjects (15). Again, the resulting apoC1-mediated blockade of the CETP-mediated flux of cholesteryl esters out of HDL might actually provide an explanation for the positive correlation between plasma apoC1 and HDL-C in normolipidemic CAD patients of the present study as well as in 85-year-old participants of the prospective population-based Leiden 85-Plus Study (18). The CETP-dependent mechanism comes in addition to the effect of apoC1 on LCAT (36, 37), HL (38, 39), and SRB1 (40). In fact, the CETP modulatory effect of apoC1 might normally contribute to its effect on plasma cholesterol distribution. Indeed, higher HDL-C to LDL-C ratio (*i.e.*, the hallmark of an effective CETP activity blockade) was measured in the present study in normolipidemic patients with high versus low plasma apoC1 concentration.

Fig. 4. Relationship between apolipoprotein C1 concentration and HDL-C levels in total patients (A) and in subgroups of patients presenting with normolipidemia (B), hypercholesterolemia (C), hypertriglyceridemia (D), or combined hyperlipidemia (E) (patient subgroups and statistics as in legend to Fig. 1).

TABLE 4. Distribution of blood lipid parameters according to the median of apoC1 concentration in either total population or subgroups of normolipidemic and dyslipidemic patients

	Total						Normolipidemia						Hypercholesterolemia						Hypertriglyceridemia						Combined Hyperlipidemia								
	ApoC1 Median			Difference			ApoC1 Median			Difference			ApoC1 Median			Difference			ApoC1 Median			Difference			ApoC1 Median			Difference					
	Below	Above	(%)	Below	Above	(%)	Below	Above	(%)	Below	Above	(%)	Below	Above	(%)	Below	Above	(%)	Below	Above	(%)	Below	Above	(%)	Below	Above	(%)	Below	Above	(%)			
Glycemia (mmol/l)	5.42 ± 0.57	5.48 ± 0.87	1.1	5.44 ± 0.56	5.26 ± 0.72	-3.4	5.37 ± 0.6	5.3 ± 0.81	-1.3	5.21 ± 0.34	5.9 ± 1.14 ^b	13.3	5.62 ± 0.63	5.64 ± 0.75	0.3	5.55 ± 0.7	5.74 ± 0.9	3.4	5.42 ± 0.57	5.48 ± 0.87	1.1	5.44 ± 0.56	5.26 ± 0.72	-3.4	5.37 ± 0.6	5.3 ± 0.81	-1.3	5.21 ± 0.34	5.9 ± 1.14 ^b	13.3	5.62 ± 0.63	5.64 ± 0.75	0.3
Total cholesterol (mmol/l)	4.25 ± 1.01	4.72 ± 1.09 ^a	10.9	3.68 ± 0.58	3.85 ± 0.78	4.6	4.8 ± 0.93	5.42 ± 0.77 ^b	13.0	3.84 ± 0.94	4.3 ± 0.89	11.8	5.55 ± 0.7	5.74 ± 0.9	3.4	4.25 ± 1.01	4.72 ± 1.09 ^a	10.9	3.68 ± 0.58	3.85 ± 0.78	4.6	4.8 ± 0.93	5.42 ± 0.77 ^b	13.0	3.84 ± 0.94	4.3 ± 0.89	11.8	5.55 ± 0.7	5.74 ± 0.9	3.4			
Triglycerides (mmol/l)	1.89 ± 2.75	1.77 ± 1	-6.1	1.09 ± 0.34	1.1 ± 0.31	1.1	1.26 ± 0.36	1.29 ± 0.25	1.9	4.5 ± 4.92	2.3 ± 0.5	-48.8	5 ± 5.61	2.83 ± 1.33	-43.3	1.89 ± 2.75	1.77 ± 1	-6.1	1.09 ± 0.34	1.1 ± 0.31	1.1	1.26 ± 0.36	1.29 ± 0.25	1.9	4.5 ± 4.92	2.3 ± 0.5	-48.8	5 ± 5.61	2.83 ± 1.33	-43.3			
HDL-C (mmol/l)	1.23 ± 0.33	1.35 ± 0.39 ^b	9.3	1.25 ± 0.36	1.51 ± 0.51 ^b	20.7	1.25 ± 0.32	1.39 ± 0.25	11.0	1.03 ± 0.3	1.14 ± 0.26	10.9	1.25 ± 0.25	1.24 ± 0.26	-1.5	1.23 ± 0.33	1.35 ± 0.39 ^b	9.3	1.25 ± 0.36	1.51 ± 0.51 ^b	20.7	1.25 ± 0.32	1.39 ± 0.25	11.0	1.03 ± 0.3	1.14 ± 0.26	10.9	1.25 ± 0.25	1.24 ± 0.26	-1.5			
LDL-C (mmol/l)	2.52 ± 0.78	2.66 ± 0.9	5.6	2.01 ± 0.37	1.94 ± 0.46	-3.4	3.2 ± 0.58	3.45 ± 0.65	8.0	1.91 ± 0.54	2.17 ± 0.31	13.5	3.38 ± 0.57	3.44 ± 0.72	1.8	2.52 ± 0.78	2.66 ± 0.9	5.6	2.01 ± 0.37	1.94 ± 0.46	-3.4	3.2 ± 0.58	3.45 ± 0.65	8.0	1.91 ± 0.54	2.17 ± 0.31	13.5	3.38 ± 0.57	3.44 ± 0.72	1.8			
HDL-C ratio	0.53 ± 0.21	0.57 ± 0.28	7.2	0.64 ± 0.22	0.81 ± 0.31 ^b	26.3	0.4 ± 0.11	0.41 ± 0.09	3.9	0.55 ± 0.16	0.54 ± 0.15	-3.3	0.38 ± 0.08	0.37 ± 0.11	-1.3	0.53 ± 0.21	0.57 ± 0.28	7.2	0.64 ± 0.22	0.81 ± 0.31 ^b	26.3	0.4 ± 0.11	0.41 ± 0.09	3.9	0.55 ± 0.16	0.54 ± 0.15	-3.3	0.38 ± 0.08	0.37 ± 0.11	-1.3			
CETP mass (mg/l)	2.76 ± 0.78	2.77 ± 0.75	0.6	2.53 ± 0.67	2.56 ± 0.59	1.1	3.13 ± 0.89	3.19 ± 0.79	2.0	2.73 ± 0.89	2.56 ± 0.64	-6.2	2.75 ± 0.52	2.86 ± 0.85	4.2	2.76 ± 0.78	2.77 ± 0.75	0.6	2.53 ± 0.67	2.56 ± 0.59	1.1	3.13 ± 0.89	3.19 ± 0.79	2.0	2.73 ± 0.89	2.56 ± 0.64	-6.2	2.75 ± 0.52	2.86 ± 0.85	4.2			
CETP activity (nmol HCE/h)	0.74 ± 0.35	0.66 ± 0.3 ^b	-10.6	0.7 ± 0.36	0.5 ± 0.2 ^a	-28.1	0.78 ± 0.37	0.63 ± 0.2 ^b	-19.0	0.74 ± 0.2	0.82 ± 0.35	10.4	0.83 ± 0.32	0.81 ± 0.33	-3.2	0.74 ± 0.35	0.66 ± 0.3 ^b	-10.6	0.7 ± 0.36	0.5 ± 0.2 ^a	-28.1	0.78 ± 0.37	0.63 ± 0.2 ^b	-19.0	0.74 ± 0.2	0.82 ± 0.35	10.4	0.83 ± 0.32	0.81 ± 0.33	-3.2			
ApoC1 mass (mg/l)	40.3 ± 7	63.45 ± 10.54 ^a	57.4	40.9 ± 7.09	62.39 ± 8.44 ^a	52.6	39.22 ± 7.14	66.37 ± 12.58 ^a	69.2	39.96 ± 6.6	61.4 ± 10.15 ^a	53.7	40.79 ± 6.91	63.99 ± 11.48 ^a	56.9	40.3 ± 7	63.45 ± 10.54 ^a	57.4	40.9 ± 7.09	62.39 ± 8.44 ^a	52.6	39.22 ± 7.14	66.37 ± 12.58 ^a	69.2	39.96 ± 6.6	61.4 ± 10.15 ^a	53.7	40.79 ± 6.91	63.99 ± 11.48 ^a	56.9			

The median value for apoC1 was 50.6 mg/l. Otherwise specified, values are mean ± SD. Statistically significant differences are presented with bold values.

^aP < 0.001 for apoC1 "above" versus apoC1 "below" the median value.

^bP < 0.05 for apoC1 "above" versus apoC1 "below" the median value.

Whereas the present study conducted in patients with CAD brings new support to the physiological relevance of the CETP-inhibitory property of human apoC1, the apoC1-dependent modulation of both CETP activity and plasma cholesterol distribution appeared to operate mostly in normolipidemic patients. All the patients were under statin therapy. Thus, the preservation of the CETP inhibitory property of apoC1 in patients with normalized lipoprotein profile might have made a significant contribution to the reduction in cholesteryl ester transfer rates after statin treatment. It comes in addition to the previously reported decrease in CETP mass and apoB-containing lipoprotein acceptors after statin treatment (41). Two main reasons might account for the partial or complete loss of CETP inhibitory potential of apoC1 in subgroups of patients with hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, or combined hyperlipidemia, who all displayed significantly higher plasma TG levels compared with patients in the normolipidemic subgroup. First, and in accordance with earlier observations in type 2 diabetic patients (4), abundant TRL, as preferential acceptors of HDL cholesteryl esters, probably drives the CETP-mediated cholesteryl ester transfer reaction. As a consequence, it is conceivable that variations in the level of the apoC1 inhibitor would have a weaker impact as triglyceridemia increases. Second, because HDL-bound apoC1 [*i.e.*, the only one to be able to inhibit CETP activity (22)] is known to come largely from the dissociation of VLDL-associated apoC1 during the course of lipolysis (29), accumulation of circulating apoB-containing lipoproteins might result in the sequestration of apoC1 in these fractions and finally loose control of the CETP-mediated redistribution of cholesterol between circulating lipoproteins. In support of this hypothesis, the CETP inhibitory potential of apoC1 was found to decrease as lipoprotein size increases (14), and VLDL-bound apoC1, unlike HDL-bound apoC1, was found to be ineffective as a CETP inhibitor (22). In new support of the blunted inhibitory potential of apoC1 when apoB-containing lipoproteins accumulate, we report here that plasma triglycerides correlate positively with nonactive, VLDL-bound apoC1 in a group of healthy subjects. It suggests further that the concomitant enrichment of TG-rich remnant lipoproteins with cholesterol and apoC1, which was reported to occur earlier in men with either early carotid atherosclerosis (35) or CAD (34) could actually relate, at least in part, to unrestrained plasma CETP activity, because apoC1 no longer operates as a CETP inhibitor when bound to apoB-containing lipoproteins. It might also account for the recent observation that apoC1 is an independent risk factor, and not a protective one, in patients with metabolic syndrome and systemic inflammation (42).

We conclude that apoC1 has the ability to inhibit CETP activity in normolipidemic subjects, thus contributing to the modulation of cholesterol distribution between HDL and apoB-containing lipoproteins. Importantly, and unlike in normolipidemic individuals, apoC1 does not operate properly as a CETP inhibitor in dyslipidemic patients, in particular those with hypertriglyceridemia or combined hyperlipidemia. Whether in this case treatment with

pharmacological CETP inhibitors might compensate for blunted endogenous CETP inhibition is unknown. 

The authors thank Philip Bastable for manuscript editing.

REFERENCES

- Gotto, A. M., Jr., and E. A. Brinton. 2004. Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43**: 717–724.
- Barter, P. J., H. B. Brewer, Jr., M. J. Chapman, C. H. Hennekens, D. J. Rader, and A. R. Tall. 2003. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**: 160–167.
- Boekholdt, S. M., J. A. Kuivenhoven, N. J. Wareham, R. J. Peters, J. W. Jukema, R. Luben, S. A. Bingham, N. E. Day, J. J. Kastelein, and K. T. Khaw. 2004. Plasma levels of cholesteryl ester transfer protein and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the prospective EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition)-Norfolk population study. *Circulation.* **110**: 1418–1423.
- de Vries, R., F. G. Perton, G. M. Dallinga-Thie, A. M. van Roon, B. H. Wollenbuttel, A. van Tol, and R. P. Dullaart. 2005. Plasma cholesteryl ester transfer is a determinant of intima-media thickness in type 2 diabetic and nondiabetic subjects: role of CETP and triglycerides. *Diabetes.* **54**: 3554–3559.
- Klerkx, A. H., G. J. de Grooth, A. H. Zwiderman, J. W. Jukema, J. A. Kuivenhoven, and J. J. Kastelein. 2004. Cholesteryl ester transfer protein concentration is associated with progression of atherosclerosis and response to pravastatin in men with coronary artery disease (REGRESS). *Eur. J. Clin. Invest.* **34**: 21–28.
- Zeller, M., D. Masson, M. Farnier, L. Logris, V. Deckert, J. P. Pais de Barros, C. Desrumaux, P. Sicard, J. Grober, D. Blache, et al. 2007. High serum cholesteryl ester transfer rates and small high-density lipoproteins are associated with young age in patients with acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**: 1948–1955.
- Barter, P. J., M. Caulfield, M. Eriksson, S. M. Grundy, J. J. Kastelein, M. Komajda, J. Lopez-Sendon, L. Mosca, J. C. Tardif, D. D. Waters, et al. 2007. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N. Engl. J. Med.* **357**: 2109–2122.
- Cannon, C. P., H. M. Dansky, M. Davidson, A. M. Gotto, Jr., E. A. Brinton, A. L. Gould, M. Stepanavage, S. X. Liu, S. Shah, J. Rubino, et al. 2009. Design of the DEFINE trial: determining the efficacy and tolerability of CETP inhibition with anacetrapib. *Am. Heart J.* **158**: 513–519.e3.
- Cannon, C. P., S. Shah, H. M. Dansky, M. Davidson, E. A. Brinton, A. M. Gotto, M. Stepanavage, S. X. Liu, P. Gibbons, T. B. Ashraf, et al. 2010. Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **363**: 2406–2415.
- Fayad, Z. A., V. Mani, M. Woodward, D. Kallend, M. Abt, T. Burgess, V. Fuster, C. M. Ballantyne, E. A. Stein, J. C. Tardif, et al. 2011. Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial. *Lancet.* **378**: 1547–1559.
- Barter, P. J., and M. E. Jones. 1980. Kinetic studies of the transfer of esterified cholesterol between human plasma low and high density lipoproteins. *J. Lipid Res.* **21**: 238–249.
- Gautier, T., D. Masson, J. P. de Barros, A. Athias, P. Gambert, D. Aunis, M. H. Metz-Boutigue, and L. Lagrost. 2000. Human apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity. *J. Biol. Chem.* **275**: 37504–37509.
- Wang, X., D. M. Driscoll, and R. E. Morton. 1999. Molecular cloning and expression of lipid transfer inhibitor protein reveals its identity with apolipoprotein F. *J. Biol. Chem.* **274**: 1814–1820.
- Dumont, L., T. Gautier, J. P. de Barros, H. Laplanche, D. Blache, P. Ducoroy, J. Fruchart, J. C. Fruchart, P. Gambert, D. Masson, et al. 2005. Molecular mechanism of the blockade of plasma cholesteryl ester transfer protein by its physiological inhibitor apolipoprotein CI. *J. Biol. Chem.* **280**: 38108–38116.
- de Barros, J. P., A. Boualam, T. Gautier, L. Dumont, B. Vergès, D. Masson, and L. Lagrost. 2009. Apolipoprotein CI is a physiological

- regulator of cholesteryl ester transfer protein activity in human plasma, but not in rabbit plasma. *J. Lipid Res.* **50**: 1842–1851.
16. Gautier, T., D. Masson, M. C. Jong, L. Duverneuil, N. Le Guern, V. Deckert, J. P. Pais de Barros, L. Dumont, A. Bataille, Z. Zak, et al. 2002. Apolipoprotein C-I deficiency markedly augments plasma lipoprotein changes mediated by human cholesteryl ester transfer protein (CETP) in CETP transgenic/ApoC-I-knocked out mice. *J. Biol. Chem.* **277**: 31354–31363.
 17. Gautier, T., D. Masson, M. C. Jong, J. P. Pais de Barros, L. Duverneuil, N. Le Guern, V. Deckert, L. Dumont, A. Bataille, Z. Zak, et al. 2005. Apolipoprotein C-I overexpression is not a relevant strategy to block cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity in CETP transgenic mice. *Biochem. J.* **385**: 189–195.
 18. Berbée, J. F., S. P. Mooijjaart, A. J. de Craen, L. M. Havekes, D. van Heemst, P. C. Rensen, and R. G. Westendorp. 2008. Plasma apolipoprotein C-I protects against mortality from infection in old age. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **63**: 122–126.
 19. Carlson, L. A., and L. Holmquist. 1982. Concentrations of apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III and E in sera from normal men and their relation to serum lipoprotein levels. *Clin. Chim. Acta.* **124**: 163–178.
 20. Mancina, G., G. De Backer, A. Dominiczak, R. Cifkova, R. Fagard, G. Germano, G. Grassi, A. M. Heagerty, S. E. Kjeldsen, S. Laurent, et al. 2007. Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* **28**: 1462–1536.
 21. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* **106**: 3143–3421.
 22. Dautin, G., Z. Soltani, D. Ducloux, T. Gautier, J. P. Pais de Barros, P. Gambert, L. Lagrost, and D. Masson. 2007. Hemodialysis reduces plasma apolipoprotein C-I concentration making VLDL a better substrate for lipoprotein lipase. *Kidney Int.* **72**: 871–878.
 23. Freeman, D. J., B. A. Griffin, A. P. Holmes, G. M. Lindsay, D. Gaffney, C. J. Packard, and J. Shepherd. 1994. Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors. Associations between the TaqI B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. *Arterioscler. Thromb.* **14**: 336–344.
 24. Nillesen, W. M., H. J. Smeets, and B. A. van Oost. 1990. Human ApoC1 HpaI restriction site polymorphism revealed by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3428.
 25. Xu, Y., L. Berglund, R. Ramakrishnan, R. Mayeux, C. Ngai, S. Holleran, B. Tycko, T. Leff, and N. S. Shachter. 1999. A common Hpa I RFLP of apolipoprotein C-I increases gene transcription and exhibits an ethnically distinct pattern of linkage disequilibrium with the alleles of apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* **40**: 50–58.
 26. Hixson, J. E., and D. T. Vernier. 1990. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J. Lipid Res.* **31**: 545–548.
 27. Guyard-Dangremont, V., L. Lagrost, P. Gambert, and C. Lallemand. 1994. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay of the human cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Clin. Chim. Acta.* **231**: 147–160.
 28. Mak, P. A., B. A. Laffitte, C. Desrumaux, S. B. Joseph, L. K. Curtiss, D. J. Mangelsdorf, P. Tontonoz, and P. A. Edwards. 2002. Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**: 31900–31908.
 29. Cohn, J. S., M. Tremblay, R. Batal, H. Jacques, L. Veilleux, C. Rodriguez, L. Bernier, O. Mamer, and J. Davignon. 2002. Plasma kinetics of VLDL and HDL apoC-I in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects. *J. Lipid Res.* **43**: 1680–1687.
 30. Westerterp, M., W. de Haan, J. F. Berbée, L. M. Havekes, and P. C. Rensen. 2006. Endogenous apoC-I increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL. *J. Lipid Res.* **47**: 1203–1211.
 31. Weisgraber, K. H., R. W. Mahley, R. C. Kowal, J. Herz, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 1990. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* **265**: 22453–22459.
 32. Shachter, N. S., T. Ebara, R. Ramakrishnan, G. Steiner, J. L. Breslow, H. N. Ginsberg, and J. D. Smith. 1996. Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C-I. *J. Clin. Invest.* **98**: 846–855.
 33. Jong, M. C., V. E. Dahlmans, P. J. van Gorp, K. W. van Dijk, M. L. Breuer, M. H. Hofker, and L. M. Havekes. 1996. In the absence of the low density lipoprotein receptor, human apolipoprotein C-I overexpression in transgenic mice inhibits the hepatic uptake of very low density lipoproteins via a receptor-associated protein-sensitive pathway. *J. Clin. Invest.* **98**: 2259–2267.
 34. Björkregren, J., S. Boquist, A. Samnegård, P. Lundman, P. Tornvall, C. G. Ericsson, and A. Hamsten. 2000. Accumulation of apolipoprotein C-I-rich and cholesterol-rich VLDL remnants during exaggerated postprandial triglyceridemia in normolipidemic patients with coronary artery disease. *Circulation.* **101**: 227–230.
 35. Hamsten, A., A. Silveira, S. Boquist, R. Tang, M. G. Bond, U. de Faire, and J. Björkregren. 2005. The apolipoprotein C-I content of triglyceride-rich lipoproteins independently predicts early atherosclerosis in healthy middle-aged men. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**: 1013–1017.
 36. Soutar, A. K., C. W. Garner, H. N. Baker, J. T. Sparrow, R. L. Jackson, A. M. Gotto, and L. C. Smith. 1975. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry.* **14**: 3057–3064.
 37. Jonas, A., S. A. Sweeny, and P. N. Herbert. 1984. Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin: cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **259**: 6369–6375.
 38. Kinnunen, P. K., and C. Ehnolm. 1976. Effect of serum and Capoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett.* **65**: 354–357.
 39. Conde-Knape, K., A. Bensadoun, J. H. Sobel, J. S. Cohn, and N. S. Shachter. 2002. Overexpression of apoC-I in apoE-null mice: severe hypertriglyceridemia due to inhibition of hepatic lipase. *J. Lipid Res.* **43**: 2136–2145.
 40. de Haan, W., R. Out, J. F. Berbée, C. C. van der Hoogt, K. W. van Dijk, T. J. van Berkel, J. A. Romijn, J. W. Jukema, L. M. Havekes, and P. C. Rensen. 2008. Apolipoprotein C-I inhibits scavenger receptor BI and increases plasma HDL levels in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**: 1294–1298.
 41. Chapman, M. J., W. Le Goff, M. Guerin, and A. Kontush. 2010. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Eur. Heart J.* **31**: 149–164.
 42. van der Ham, R. L., R. A. Dehnavi, G. A. van den Berg, H. Putter, A. de Roos, J. F. Berbée, J. A. Romijn, P. C. Rensen, and J. T. Tamsma. 2009. Apolipoprotein C-I levels are associated with atherosclerosis in men with the metabolic syndrome and systemic inflammation. *Atherosclerosis.* **203**: 355–357.

3- Discussion

Nous avons démontré dans cette étude, chez des patients atteints d'une coronaropathie documentée, que les taux plasmatiques de triglycérides n'étaient pas différents selon que la concentration en apoC1 soit inférieure ou supérieure à la médiane de concentration plasmatique en apoC1 (50,6 mg/L). De plus, les concentrations moyennes en apoC1 étaient similaires dans les sous groupes de patients normolipidémiques et hyperlipidémiques (tableau 2). Alors qu'il a été démontré que les souris transgéniques surexprimant l'apoC1 humaine présentaient une hypertriglycéridémie en lien avec une diminution de la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides (285,286) et que chez l'homme l'hypertriglycéridémie était associée à une augmentation de la concentration plasmatique en apoC1 (384), il n'a pas été observé de lien entre les concentrations plasmatiques en triglycérides et en apoC1 au sein de la population de patients à haut risque cardio-vasculaire étudiée ici. Il est intéressant de noter qu'il a été démontré que le contenu en apoC1 des lipoprotéines riches en triglycérides n'était pas un facteur prédictif de la concentration postprandiale en triglycérides au sein d'une population d'hommes d'âge moyen avec des signes d'athérosclérose précoce (386).

L'apoC1 est produite essentiellement dans le foie et est libérée dans la circulation sanguine liée aux VLDL. Elle se dissocie rapidement des VLDL pour se lier aux HDL qui sont les principaux porteurs de l'apoC1 dans le plasma des sujets normolipidémiques (247). Nous avons vu que l'apoC1 était un inhibiteur physiologique de l'activité CETP. L'apoC1 possède cette capacité d'inhibition lorsqu'elle est liée aux HDL. Or, La CETP est un puissant facteur prédictif négatif du taux plasmatique de HDL-C (248,366). La corrélation positive entre l'apoC1 plasmatique et la concentration en HDL observée chez les patients coronariens normolipidémiques de notre étude peut s'expliquer par l'inhibition, induite par l'apoC1, du flux d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et IDL, via la CETP. Cette corrélation a également été retrouvée au cours d'une étude prospective menée chez des sujets de 85 ans (366).

De plus, il semble que l'effet modulateur de l'apoC1 sur l'activité CETP impacte les effets de la CETP sur la distribution plasmatique du cholestérol. Nous avons en effet mis en évidence que le ratio HDL/LDL (qui peut être considéré comme le marqueur du blocage de l'activité CETP) était plus élevé chez les patients normolipidémiques avec une concentration plasmatique en apoC1 élevée en comparaison à ceux avec une concentration en apoC1 basse.

L'étude actuelle confirme, même s'il s'agit d'une population de patients coronariens, que l'apoC1 est un inhibiteur de l'activité CETP chez les sujets normolipidémiques. En revanche, cette capacité d'inhibition de l'apoC1 n'est pas retrouvée chez les patients hyperlipidémiques. Nous apportons deux explications potentielles à cette observation. La première est que l'abondance en lipoprotéines riches en triglycérides, accepteur préférentiel des esters de cholestérol des HDL, stimule la réaction de transfert des esters de cholestérol induite par la CETP et de ce fait surpasse l'effet inhibiteur de l'apoC1 sur la CETP. L'impact de l'apoC1 apparaît donc plus faible en situation d'hyperlipidémie.

La seconde est que l'accumulation dans la circulation sanguine de lipoprotéines contenant de l'apoB peut entraîner une diminution de la dissociation de l'apoC1 des VLDL qui est donc moins présente sur les HDL et perd ainsi son potentiel inhibiteur de la CETP, puisqu'elle est inactive lorsqu'elle est liée aux VLDL. L'observation faite (317) d'une diminution de la capacité d'inhibition de l'apoC1 lorsque la taille des lipoprotéines augmentait va dans ce sens. Nous rapportons ici que le taux plasmatique de triglycérides est corrélé positivement avec l'apoC1 non active, liée aux VLDL, dans un sous groupe de sujets, ce qui renforce l'idée que le potentiel inhibiteur de l'apoC1 est altéré lorsque les lipoprotéines contenant l'apoB s'accumulent. Cela suggère également que l'enrichissement concomitant en apoC1 et en HDL des lipoprotéines riches en TG qui a été observé chez des hommes porteurs de signes d'athérosclérose précoce (386) et d'autres coronariens (384) pourrait au moins en partie être lié à l'incapacité de l'apoC1 liée aux lipoprotéines riches en TG à inhiber l'activité CETP. Cela pourrait également intervenir dans l'étude qui montre que l'apoC1 est un facteur de risque d'athérosclérose chez des hommes porteurs d'un syndrome métabolique ou d'une infection systémique (392).

En conclusion, cette étude confirme que l'apoC1 est un inhibiteur physiologique de la CETP en situation de normoglycémie et ce même dans une population de patients coronariens. En revanche, cette capacité d'inhibition est absente en cas d'hyperlipidémie dans cette même population.

II- Perte de la capacité d'inhibition de l'apoC1 sur l'activité CETP chez des patients diabétiques de type 1 et de type 2

1- Introduction

Nous avons démontré que le potentiel inhibiteur de l'apoC1 sur la CETP était lié, au moins en partie, à la capacité de l'apoC1 de modifier la charge électrique de surface des HDL. Or cette charge électrostatique est reconnue à ce jour comme un déterminant majeur de l'interaction CETP-lipoprotéine et donc de l'échange des esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines contenant de l'apoB. Nous avons également vu que la charge positive de l'apoC1 jouait un rôle déterminant dans sa capacité d'inhibition de l'activité CETP.

Des études ont également mis en évidence une élévation de l'activité CETP chez les patients diabétiques de type 1 et de type 2. Le mécanisme précis de cette élévation reste inconnu. L'hypothèse du rôle de l'hypertriglycéridémie a été évoquée chez les patients diabétiques de type 2. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'abondance en lipoprotéines riches en triglycérides, accepteur préférentiel des esters de cholestérol des HDL, pourrait stimuler la réaction de transfert des esters de cholestérol induite par la CETP. Cependant, les patients diabétiques de type 1 ne présentent habituellement pas d'hypertriglycéridémie, ce qui laisse penser qu'un autre mécanisme puisse expliquer cette élévation de l'activité CETP.

L'hyperglycémie est la principale anomalie commune aux diabètes de type 1 et 2 et elle entraîne des phénomènes de glycation. Ces phénomènes de glycation, notamment en interagissant avec les résidus lysine et arginine des protéines, conduisent à la modification de la charge électrostatique des protéines. Sa richesse en lysine et en arginine fait de l'apoC1 une cible potentielle à la glycation, susceptible de modifier sa charge électrostatique et donc son potentiel inhibiteur de l'activité CETP.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les propriétés physicochimiques de l'apoC1 pouvaient être modifiées au cours du diabète et entraîner une altération de sa capacité à inhiber la CETP.

Nous avons donc étudié l'effet de la glycation *in vitro* de l'apoC1 sur sa charge électrique et sur sa capacité à inhiber l'activité CETP. Puis nous avons évalué la pertinence physiopathologique des résultats *in vitro* chez des patients diabétiques de type 1 et 2, en comparaison à une population saine normolipidémique et normoglycémique.

2- Communication orale

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale lors du congrès international de la Société Européenne d'Athérosclérose en Juin 2013 (Annexe 1).

3- Poster commenté

Ce travail a fait l'objet d'un poster commenté lors du congrès national de la Société Française de Diabétologie en Mars 2013 (Annexe 2).

4- Article n°2

Article soumis dans Diabetes Care en cours de révision (Annexe 3).

Glycation of apolipoprotein C1 impairs its CETP inhibitory property: pathophysiological relevance in patients with type 1 and type 2 diabetes

Benjamin Bouillet^{1,2} MD, Thomas Gautier² PHD, Denis Blache² PHD, Jean-Paul Pais de Barros², Laurence Duvillard² MD PHD, Jean-Michel Petit^{1,2} MD PHD, Laurent Lagrost² PHD, Bruno Vergès^{1,2} MD PHD

¹ Service Endocrinologie, Diabétologie et Maladies Métaboliques, University Hospital of Dijon, France

² INSERM research centre UMR 866, University of Bourgogne, Dijon, France

ABSTRACT

Apolipoprotein C1 (apoC1) is a potent physiological inhibitor of Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP). ApoC1 operates through its ability to modify the electrostatic charge at the lipoprotein surface.

We aimed to determine whether *in vitro* glycation of apoC1 influences its electrostatic charge and its CETP inhibitory effect, and whether these modifications may occur *in vivo* in patients with diabetes, thus contributing to abnormally elevated CETP activity in this population.

The consequences of *in vitro* glycation by methylglyoxal on the electrostatic properties of apoC1 and on its inhibitory effect on CETP activity were studied. An isoelectric analysis of apoC1 was performed in patients with type 1 diabetes and in normolipidemic-normoglycemic subjects. ApoC1 concentrations and CETP activity were measured in 70 patients with type 1 diabetes, 113 patients with type 2 diabetes and 83 controls.

In vitro glycation of apoC1 modified its electrostatic charge and abrogated its ability to inhibit CETP activity in a concentration-dependent manner. The isoelectric point of apoC1 in controls was significantly higher than that in patients with type 1 diabetes. An independent negative correlation was found between CETP activity and apoC1 in controls but not in patients with diabetes. HbA1C was independently associated with CETP activity in patients with type 1 diabetes.

The ability of apoC1 to inhibit CETP activity is impaired in patients with diabetes. Glycation of apoC1 leads to a change in its electrostatic properties which might account, at least in part for a loss of constitutive CETP inhibition and an increase in plasma CETP activity in patients with diabetes.

INTRODUCTION

Apolipoprotein C1 (apoC1), a small, basic apolipoprotein mainly produced by the liver (1,2), has been shown to play a significant and complex role in VLDL and HDL metabolism. ApoC1 was found to stimulate hepatic production of VLDL (3), to inhibit the hydrolysis of VLDL (4–6), and to impair the recognition of VLDL by its cellular receptors (7–10). *In vivo* studies in animal models support the hypothesis that apoC1 plays a complex and significant role in both the accumulation of VLDL particles in the blood stream and the reduction in their cholesteryl ester content relative to triglycerides (11–15).

In addition, apoC1 has been shown to be a potent inhibitor of CETP activity. *In vitro*, apoC1 inhibits CETP activity when associated with the plasma HDL fraction (16). The physiological relevance of apoC1 as a CETP inhibitor has been shown in apoC1-knocked out/human CETP transgenic and human apoC1 transgenic/human CETP transgenic mice (17,18). The inhibitory effect of apoC1 was found to rely, at least in part, on its ability to modulate the electrostatic charge at the HDL surface, which is recognized as a major determinant of the CETP-lipoprotein interaction and thus of the exchange of core neutral lipids (19,20). In healthy, normolipidemic subjects, the concentration of plasma apoC1 has been shown to correlate negatively with CETP activity, and positively with plasma HDL cholesterol levels (21,22). In contrast, such relationships were not observed in non-diabetic patients with hypertriglyceridemia or combined hyperlipidemia on secondary prevention (21), suggesting that apoC1 might become dysfunctional as a constitutive/endogenous CETP inhibitor in high-risk populations.

Glycation is known to change side chains of reactive amino acids, essentially lysine and arginine, to form Schiff base and to reduce the isoelectric point of proteins (pI) (23). Glycation is a consequence of hyperglycemia during diabetes.

ApoC1, the smallest molecule among the apolipoprotein family (57 amino acids) is a highly basic protein containing 9 lysine residues and 3 arginine residues and is thus likely to be susceptible to glycation.

We hypothesized that glycation of apoC1 might change its electrostatic properties, which are critical in its inhibitory effect, and might impair its ability to inhibit CETP activity. We also hypothesized that the physicochemical properties of apoC1 might be altered in diabetes and might result in the impairment of its ability to modulate CETP activity.

In the first part of the present study, the effect of *in vitro* glycation of apoC1 on its electrostatic charge properties was investigated and the consequences of this on its ability to inhibit CETP activity were determined. In the second part, the pathophysiological relevance of the *in vitro* results was assessed in patients with type 1 and type 2 diabetes in comparison with healthy normolipidemic-normoglycemic individuals. This study provides evidence of abnormalities in the electrostatic properties of apoC1 in patients with type 1 and type 2 diabetes and the impact of these abnormalities on the ability of apoC1 to inhibit CETP.

METHODS

Purification of apolipoprotein C1 by chromatofocusing

ApoC1 was purified from delipidated HDL apolipoproteins by using the chromatofocusing method of Tournier *et al* (24). Purified apoC1, which appeared as a homogenous band on the polyacrylamide gel, was dialyzed against Tris-buffered saline.

Preparation of lipoproteins

HDLs were isolated from plasma by sequential flotation ultracentrifugation, according to their density. Apolipoprotein B-containing lipoproteins (density (d) <1.063 g/mL) were removed from the top of the plasma samples, after a 13-hour run at 50000 rpm, in a 70 Ti rotor on an XL-90 ultracentrifuge (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Then, HDLs were prepared from the infranatant adjusted to a density of 1.21 g/mL by a 20-hour run at 45000 rpm. HDLs were dialysed overnight against 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4 buffer (TBS).

Protein concentration was measured using bicinchoninic acid reagent (Pierce) according to Smith *et al* (25).

In vitro glycation of apoC1 and HDL with methylglyoxal

Methylglyoxal (MG) was used to glycate *in vitro* apoC1 and HDL.

MG reacts with the free amino groups of lysine and arginine (23). Thirteen reactive groups are contained in 1 mol of apoC1 and 112 reactive groups are contained in 1 mol of HDL. The amount of MG used is represented as the ratio of the reactive groups in apoC1 and HDL that can interact with MG.

Fifty micrograms of apoC1 were treated with 0, 10, 25, 50, 100 and 500 nmol of MG corresponding to a ratio of 0:1, 0.1:1, 0.25:1, 0.5:1, 1:1 and 5:1 of apoC1 reactive groups, and 23 mg of HDL were treated with 0, 7.07, 28.28 and 141.00 μ mol of MG corresponding to a ratio of 0:1, 0.25:1, 1:1 and 5:1 of HDL reactive groups.

The mixtures were incubated for 24 h at 37°C and dialyzed twice for 16h against TBS.

Isoelectric analysis

Native apoC1, MG-treated apoC1, and HDL apoproteins from controls (n=6) or patients with type 1 diabetes (n=6) and protein pI standards (SERVA) were diluted in 125 μ l of hydration buffer (8 mol/l urea, 4% CHAPS, 20 mmol/l dithiothreitol, 0.2% Bio-Lyte 3-10). After overnight hydration of 7-cm-long ReadyStrip, pH3-10 (Bio Rad), at 50 V in a Protean IEF cell (Bio-Rad), isoelectric focusing was conducted for 12 kV-h. The strips were either stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 or proteins were transferred to a PVDF membrane for western blotting with a rabbit anti-human apoC1-immunoglobulin and an HRP-conjugated antirabbit antibody (Dako). Blots were analyzed with Image Lab software on a Chemidoc device (Bio Rad).

Measurement of cholesteryl ester transfer activity by the fluorescent method

For the in vitro analyses, CETP activity was assessed by the fluorescent method using microplates and donor liposomes enriched with nitrobenzoxadiazol (NBD)-labeled cholesteryl esters (phospholipid/cholesterol/NBD-cholesteryl ester molar ratio, 1:1:1) (Roar Biomedical, NY, USA).

For the measurement of cholesteryl ester transfer activity with apoC1, donor liposomes (5 μ l), acceptor VLDL (5 μ l) and purified CETP were incubated in the presence of 250 pmol of native apoC1 or MG-treated apoC1.

For the measurement of cholesteryl ester transfer activity with HDL, donor liposomes (5 μ l) and purified CETP (5 μ l) were incubated in the presence 125 μ l of control HDL or HDL treated with MG (100 nmol of cholesterol).

Final volumes were adjusted to 250 μ l with TBS and the mixtures were incubated in triplicate for 3 h at 37°C in a Victor2 1420 multilabel counter (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). The CETP-mediated transfer of NBD-cholesteryl esters from self-quenched donors to acceptor lipoproteins was monitored by the increase in fluorescence intensity (excitation, 465 nm; emission, 535 nm) and the results were expressed in fluorescence arbitrary units after the deduction of blank values that were obtained with control mixtures without CETP.

Agarose Gel Electrophoresis

The electrophoretic mobility of native or MG-treated HDL was determined by electrophoresis on 0.5% agarose gels (Paragon Lipo kit, Beckman Instruments) according to the method of Sparks and Phillips (26).

Study design and patients

Seventy patients with type 1 diabetes, 113 patients with type 2 diabetes and 83 normoglycemic-normolipidemic controls were studied. All subjects were older than 18 years.

Controls were not taking any treatment that could interfere with lipoprotein metabolism (lipid-lowering agents, anti-HIV agents, combined oral contraceptive pill, corticoids and retinoic acid), none were pregnant, the fasting glycaemia level was lower than 6.1 mmol/l, the

triglyceride (TG) level was below 1.7 mmol/l and the LDL-cholesterol (LDL-C) level was lower than 4.128 mmol/l.

In patients with type 1 and type 2 diabetes, the presence of microvascular complications (retinopathy and nephropathy), the type of treatment for diabetes and the duration of diabetes were recorded. Three stages were used to define nephropathy: 0 for no nephropathy, 1 for microalbuminuria between 30 and 300 mg per day and 2 for proteinuria > 300 mg per day.

This prospective single-centre study was approved by our regional ethics committee. Written informed consent was obtained from all patients before inclusion in this study.

Plasma preparation

Blood samples were collected at inclusion and were centrifuged for serum separation within 2 hours following collection. The plasma was divided into aliquots and stored at -80°C until biological analysis.

Biochemical assay

Fasting plasma glucose, plasma creatinine, fasting total and HDL-cholesterol (HDL-C) and triglycerides were measured on a Vista analyser with dedicated reagents (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA). LDL-C was calculated by the Friedewald equation when TG levels were below 3.87 mmol/L (27). When TG levels were above 3.87 mmol/l, LDL-C was measured directly on the Vista analyser with dedicated reagents (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA). HbA1c was measured by high performance liquid chromatography on a Variant II device (Bio Rad, Richmond, CA, USA) (normal range: 4-6% (20-60 mmol/mol)).

Apolipoprotein C1 concentration

ApoC1 was measured in total plasma by a specific ELISA using an anti-human apoC1 antiserum from rabbit as previously described (28).

Measurement of cholesteryl ester transfer activity using a radioactivity method

Cholesteryl ester transfer activity in individual plasma samples was the measured transfer from [³H] cholesteryl ester-containing HDL toward endogenous apoB-containing lipoproteins. The cholesteryl ester transfer rate was calculated from the known specific radioactivity of the HDL donors and the accumulation of radiolabeled cholesteryl esters in the LDL acceptors after the deduction of blank values from control mixtures that were incubated at 37°C without a plasma sample (16,29).

CETP mass concentration was measured by a specific ELISA with TP1 anti-CETP antibodies as previously described (30). CETP activity values were calculated as the ratio of the plasma cholesteryl ester transfer rate to the plasma CETP mass concentration and were expressed as nmol of ³H-CE transferred per mg of CETP per hour.

Statistics

Data are shown as means \pm SD or percentages as indicated. Differences between two groups were evaluated by the Student t-test for continuous variables. Differences between more than two groups for continuous variables were analyzed by ANOVA.

The Pearson correlation coefficients were determined by linear regression analysis. Statistical significance of the correlation coefficients was determined by the method of Fisher and Yates.

Multivariate analyses were done with CETP activity as a dependent variable in each group (controls, T1D, T2D). The variables introduced into the model were age, BMI, HDL-C, LDL-C, TG and apoC1. In addition, HbA1C and statin treatment, which has been shown to potentially modify CETP activity (32,33), were introduced into the model in patients with diabetes. Multivariate analyses were done by stepwise multivariate linear regression.

The statistical analysis was done using SPSS software (Chicago, IL, USA).

Differences with p-values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Glycation of apoC1 by methylglyoxal changes its electrostatic charge and impairs its ability to inhibit CETP activity

Glycation of apoC1 in the presence of methylglyoxal (MG) led to the emergence of new acidic isoforms as observed by isoelectric focusing (Fig.1A). A gradual shift of apparent pI values from 8.3 for native apoC1 down to 4.0 was observed when apoC1 was treated with the highest amount of MG.

In accordance with previous *in vitro* and *in vivo* studies, the addition of purified apoC1 to reconstituted mixtures containing isolated lipoprotein substrates and CETP was accompanied by a marked inhibition of the lipid transfer reaction (Fig.1B). The inhibitory potential of human apoC1 was markedly affected by pretreatment of apoC1 with MG. The potent CETP inhibitory effect of native apoC1 (5% of control transfer values with no apoC1 added) was progressively lost when apoC1 was pretreated with increasing amounts of MG, with similar, elevated transfer values in both non-supplemented/control mixtures and mixtures supplemented with apoC1 pretreated with the highest concentration of MG (Fig.1B). This indicates that when apoC1 is glycated, its inhibitory potential is markedly reduced.

Glycation of HDLs by methylglyoxal made them more electronegative and made them better substrates for CETP

Because apoC1 is an inhibitor of CETP activity when associated with HDL, the electrostatic properties of HDL and the ability of HDL to inhibit CETP activity were assessed after glycation with MG. MG-induced glycation of HDL produced a significant change in the electrostatic properties of plasma HDL, which gradually became more electronegative as the MG concentration increased (Fig.2A).

The ability of HDL treated with MG to block the lipid transfer reaction was significantly weaker than that achieved by native HDL. The cholesteryl ester transfer rate with HDL treated with the highest amount of MG was 2.2 times greater than that with native/untreated controls (Fig.2B).

Overall, and in line with earlier studies (24), the present *in vitro* experiments strengthen the hypothesis that the electrostatic charge properties of apoC1 are an important determinant of its ability to inhibit CETP activity. Importantly, *in vitro* glycation of apoC1 by methylglyoxal was shown here to abrogate its CETP inhibitory effect. Because glycation is a well-known consequence of hyperglycemia in diabetes, we set out to determine whether the electrostatic charge of apoC1 in patients with diabetes was different from that in healthy normolipidemic-normoglycemic subjects.

Electrostatic charge of plasma apoC1 is abnormal in patients with type 1 diabetes

ApoC1 is known to have a pI value of 8.3. Accordingly, and as shown in Fig.3, the pI of apoC1 in most of the healthy control ranged between 7.4 and 9.5. In patients with type 1 diabetes, however, apoC1 was shifted to lower pI values. More precisely, the proportion of apoC1 located between 7.4 and 9.5 of the pI range was significantly lower than that in controls (18.6 vs 43.2%, respectively; $p=0.0065$), whereas the proportion between 3.5 and 4.2 of pI range was significantly higher (18.1 vs 5.9%, respectively; $p=0.0067$). These results indicate that the electrostatic properties of apoC1 are modified in type 1 diabetes. This finding prompted us to study CETP activity and its relationship with plasma apoC1 concentration in patients with diabetes and in control.

CETP activity correlates with apoC1 concentrations in healthy normolipidemic-normoglycemic controls, but not in patients with type 1 and type 2 diabetes

Table 1 presents the characteristics of the subjects divided into three groups: healthy normolipidemic-normoglycemic subjects (controls), patients with type 1 diabetes (T1D), and patients with type 2 diabetes (T2D). The mean age of T1D patients and controls was similar (42.1 ± 15.9 vs. 43.07 ± 14.22 years). T2D patients were significantly older than control subjects and T1D patients (59.34 ± 9.48 years, $p < 0.001$). Plasma glucose levels were higher in T1D and T2D patients than in controls (9.69 ± 4.41 and 10.25 ± 4.2 mmol/l vs. 5.24 ± 0.44 mmol/l, respectively, $p < 0.0001$). Plasma triglycerides were higher in T2D patients than in controls (2.34 ± 1.79 vs. 0.86 ± 0.24 mmol/l, $p < 0.001$). TG levels in T1D patients were significantly higher than those in control subjects (1.16 ± 0.77 vs. 0.86 ± 0.24 mmol/l, $p < 0.0001$), and significantly lower than in T2D patients (1.16 ± 0.77 vs. 2.34 ± 1.79 mmol/l, $p < 0.0001$).

Plasma apoC1 concentrations were significantly higher in T1D and T2D patients than in control subjects (100.87 ± 27.58 , 96.7 ± 28.28 mg/l, and 86.53 ± 18.01 mg/l, respectively; $p < 0.005$). Plasma apoC1 levels in T1D and T2D patients were similar (Table 1).

CETP activity was significantly higher in T1D and T2D patients than in controls (0.32 ± 0.14 , 0.43 ± 0.13 , and 0.25 ± 0.075 nmol $^3\text{H-CE}/\text{mg}/\text{h}$, respectively; $p < 0.0001$). In addition, CETP activity was higher in T2D patients than in T1D patients ($p < 0.0001$) (Table 1).

As shown in Fig.4A and in Table 2 the plasma apoC1 concentration correlated negatively with CETP activity in normolipidemic-normoglycemic controls ($r = -0.252$, $p = 0.022$). In multivariate analysis, apoC1 concentration still correlated negatively and significantly with CETP activity ($\beta = -0.364$, $p = 0.001$) in controls. In addition, in this population, the TG level correlated positively and significantly with CETP activity ($\beta = 0.255$, $p = 0.018$) (Table 3).

In contrast to controls, no significant relationship between CETP activity and apoC1 concentration was observed in T1D and T2D patients (Fig 4B-4C).

In the T1D group, univariate analysis revealed that CETP activity correlated positively with HbA1C ($p=0.001$), LDL-C ($p=0.02$) and TG ($p<0.0001$) and negatively with HDL-C ($p<0.0001$) and age ($p=0.019$) (Table 2). In multivariate analysis, CETP activity was independently and positively associated with the TG level ($\beta=0.411$, $p<0.0001$) and HbA1C ($\beta=0.240$, $p=0.022$) and negatively with statin therapy ($\beta=-0.295$, $p=0.004$) (Table 3).

As plasma TG were higher in T1D patients than in controls and TG is known to influence CETP activity (21,31), CETP activity in one subgroup of T1D patients with plasma TG below 1.7 mmol/l was compared to CETP activity in controls. Whereas there was no significant difference, between controls and T1D patients with TG<1.7 mmol/l, in TG levels (0.86 ± 0.24 , $n=83$ versus 0.89 ± 0.27 mmol/l, $n=58$, respectively; ns), the ability of CETP to exchange cholesteryl esters was again significantly higher in T1D patients with TG<1.7 mmol/l than in controls (0.29 ± 0.12 and 0.25 ± 0.07 nmol $^3\text{H-CE/mg/h}$, respectively; $p=0.022$). In the subgroup of T1D patients with plasma triglycerides below 1.7 mmol/l, univariate analysis revealed that CETP activity correlated positively with HbA1C ($p=0.03$) and negatively with age ($p=0.037$). In multivariate analysis, CETP activity was independently and positively associated with HbA1C ($\beta=0.274$, $p=0.028$) and negatively with BMI ($\beta=0.286$, $p=0.021$) and statin therapy ($\beta=-0.250$, $p=0.044$). In contrast, no relationship between CETP activity and both apoC1 ($\beta=0.08$, $p=0.516$) and TG ($\beta=0.153$, $p=0.245$) was found in this subgroup. Finally, in order to assess the influence of HbA1C on CETP activity, we divided T1D patients into quartiles according to HbA1C. CETP activity was significantly higher in the fourth quartile ($0.42 \pm \text{nmol } ^3\text{H-CE/mg/h}$, HbA1C >9.6% (81 mmol/mol)) than in the first quartile (0.26 ± 0.07 nmol $^3\text{H-CE/mg/h}$, HbA1C<7.4% (57 mmol/mol), $p<0.0001$). No significant

difference in TG levels was observed between the first and the fourth quartile. The ANOVA analysis for CETP activity between quartiles was strongly significant ($F=6.913$, $p<0.0001$).

In patients with type 2 diabetes (most of whom were hypertriglyceridemic, as usually observed in this population), CETP activity correlated positively with total cholesterol ($p=0.004$), LDL-C ($p=0.04$) and TG ($p<0.0001$) and negatively with HDL-C ($p<0.0001$) (Table 2). Multiple linear regression analyses showed in T2D that CETP activity was independently associated with LDL-C ($\beta=0.204$, $p=0.019$), TG ($\beta=0.249$, $p=0.015$) and HDL-C ($\beta=-0.345$, $p=0.001$) (Table 3).

DISCUSSION

In the present study, *in vitro* glycation of apoC1 was found to modify its electrostatic properties and to impair its ability to inhibit CETP activity. As glycation is a consequence of hyperglycemia in diabetes, we hypothesized and demonstrated that the electrostatic properties of apoC1 are changed in patients with diabetes. The ability of apoC1 to inhibit CETP activity is shown here for the first time to be abrogated in T1D and T2D patients.

ApoC1 has been shown to be a potent inhibitor of CETP activity. ApoC1 is a highly basic protein containing 9 lysine residues and 3 arginine residues. It has been shown that the inhibitory effect of human apoC1 is a direct consequence of its unique electrostatic properties, which impair HDL-CETP interactions (19). Glycation is known to affect reactive amino acids of proteins, essentially lysine and arginine and to reduce the isoelectric point of proteins. For the first time, we investigated whether glycation could change the electrostatic properties of apoC1, and thus its ability to inhibit CETP activity, and we studied the effect of *in vitro* glycation of human apoC1 with MG (a protein glycating agent) on the electrostatic and inhibitory properties of apoC1. MG interacts with lysine and arginine residues to create Schiff bases and adducts that decrease the pI of the protein (23). As expected, the electrostatic properties of apoC1 were markedly changed by pretreatment with MG and in a concentration-dependent manner. Importantly, the decreasing electropositivity of apoC1 with increasing amounts of MG was associated with a progressive loss of the CETP inhibitory properties of apoC1. These findings are in accordance with earlier *in vitro* studies with acetylated apoC1, which linked the reduction in the positive electrostatic charge of apoC1 with its impaired inhibitory activity on CETP (19).

The electrostatic properties of apoC1 were shown *in vitro* to be able to produce a significant change in HDL electronegativity (19), which is recognized today as a leading

factor that determines both the strength of CETP-HDL interactions and the velocity of CETP-mediated lipid transfers (32–35). The inhibition of CETP activity by apoC1 is dependent, at least in part, on its peculiar electrostatic properties, and human apoC1 was found in earlier studies to contribute significantly to the overall surface charge potential of HDL (19,20). In the present study, we showed that HDLs treated with MG were more electronegative than native HDLs. The glycation of positively charged amino acid residues of apoC1 may explain why glycated HDLs are more electronegative and therefore show a weaker ability to inhibit CETP activity.

As glycation is a consequence of hyperglycemia in diabetes, we hypothesized that the electrostatic properties of apoC1 from patients with diabetes might be different from those of apoC1 from normolipidemic-normoglycemic subjects. Isoelectric analysis, conducted *in vivo* in the present study, showed that the electrostatic properties of apoC1 from T1D patients were different (reduced electropositivity) from those in control subjects. Indeed apoC1 from T1D patients was significantly less basic than control apoC1. Pretreatment of apoC1 with MG was found to modify its pI value in a similar way to what is shown in the present study to occur in T1D patients. Indeed, a 50% decrease in the major apoC1 band (pI range: 7.4-9.5) is reported here for the first time to occur in T1D patients. Interestingly, a similar 50% reduction in the 7.4-9.5 pI band was found with human apoC1 pretreated with 50% MG.

Overall, *in vitro* experiments and the changes in the electrostatic properties of apoC1 observed in T1D patients made us hypothesize that apoC1, the endogenous constitutive inhibitor of CETP (19,20), might be less effective in patients with diabetes. This prompted us to study CETP activity and apoC1 in patients with type 1 and type 2 diabetes and in normolipidemic-normoglycemic controls.

As previously reported (20,21), we found a significant negative correlation between apoC1 concentration and CETP activity in normolipidemic-normoglycemic controls. These data confirm that apoC1 is a potent endogenous inhibitor of CETP activity. One of our major results is that the inhibitory effect of apoC1 on CETP activity is abrogated in both T1D and T2D patients, as reflected by the loss of the negative correlation between specific CETP activity and apoC1 concentration in these populations. The major common abnormality in T1D and T2D is hyperglycemia. We hypothesized that hyperglycemia might be responsible for this loss of inhibitory potential. The independent association between CETP activity and HbA1C observed in T1D patients is in keeping with this hypothesis. On top of that, CETP activity in the quartile of T1D patients with the highest HbA1C level was significantly greater than that in the quartile of T1D patients with the lowest HbA1C level. The higher the degree of hyperglycemia the greater the loss of inhibitory potential of apoC1 seemed to be. We did not find a significant correlation between HbA1C and CETP activity in T2D patients, but it seems likely that hypertriglyceridemia, which is highly present in this population, has a major effect on CETP activity and thus, the effect of hyperglycemia on CETP activity may have been overwhelmed by that of hypertriglyceridemia.

In the present study, CETP activity in both T1D and T2D patients was greater than that in control subjects as previously reported (36–40). CETP activity was significantly higher in T2D than in T1D patients. This difference may be partly explained by a significantly higher TG level in T2D, which directly stimulates CETP activity. The strong and independent association between CETP activity and TG in T2D patients stresses the fact that hypertriglyceridemia is a major determinant of CETP activity as previously reported (31). Although T1D patients have plasma TG levels in the normal range, plasma TG levels were higher than those in controls, and plasma TG correlates significantly with CETP activity.

However, T1D patients with TG levels <1.7 mmol showed significantly higher CETP activity than controls when their plasma TG levels were not different from those in controls. On top of that, in this population, no correlation was observed between CETP activity and TG. Thus the greater ability of CETP to exchange cholesteryl esters between lipoproteins in T1D patients is probably due to other mechanisms than increased TG levels, such as hyperglycemia. Indeed, in T1D patients, hyperglycemia correlated with CETP activity in both univariate and multivariate analyses.

The plasma concentration of apoC1 was found to be slightly though significantly higher in T1D and T2D patients than in controls. High apoC1 concentrations were reported, in dyslipidemic patients in one clinical study (2), but not in another one (21). Although the mechanism underlying this increase remains unclear it shows that increased CETP activity in diabetic patients occurs despite elevated apoC1 concentrations, stressing once again the fact that apoC1 (i.e. an important modulator of CETP activity in normolipidemic human plasma) is dysfunctional in these patients.

We showed that *in vitro* glycation of apoC1 impairs its ability to inhibit CETP activity. We suggest that the glycation of apoC1, which modifies its electrostatic properties and thus the electrostatic properties of HDL particles, leads to increased binding of CETP to HDL and thus to increased CETP activity and cholesteryl ester transfer. We also showed *in vivo* that the electrostatic properties of apoC1 are modified in patients with T1D and that apoC1 from diabetic patients has lost its ability to inhibit CETP activity. Hyperglycemia plays a major role in the loss of the inhibitory potential of apoC1 on CETP activity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Philip Bastable for manuscript editing. This work was supported by grants from the Université de Bourgogne, the Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, the Conseil Régional de Bourgogne, the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), and a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021/LipSTIC Labex.

No potential conflict of interest relevant to this article were reported.

BV and LL developed the study concept and supervised the study. BB carried out the research, analyzed and interpreted the data, drafted the first manuscript and reviewed the paper. TG, DB and JPPDB helped with the study design. TG and DB helped with the research and the interpretation of data. JMP and LD helped with data collection. All authors contributed to the interpretation of the results, reviewed the paper and approved the final version of the manuscript.

BB is the guarantor of this work and, as such, had fully access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

REFERENCES

1. Malmendier CL, Lontie JF, Grutman GA, Delcroix C. Metabolism of apolipoprotein C-I in normolipoproteinemic human subjects. *Atherosclerosis*. 1986 nov;62(2):167–72.
2. Cohn JS, Tremblay M, Batal R, Jacques H, Veilleux L, Rodriguez C, et al. Plasma kinetics of VLDL and HDL apoC-I in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects. *J. Lipid Res*. 2002 oct;43(10):1680–7.
3. Westerterp M, de Haan W, Berbée JFP, Havekes LM, Rensen PCN. Endogenous apoC-I increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL. *J. Lipid Res*. 2006 juin;47(6):1203–11.
4. Havel RJ, Fielding CJ, Olivecrona T, Shore VG, Fielding PE, Egelrud T. Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources. *Biochemistry*. 1973 avr 24;12(9):1828–33.
5. Conde-Knape K, Bensadoun A, Sobel JH, Cohn JS, Shachter NS. Overexpression of apoC-I in apoE-null mice: severe hypertriglyceridemia due to inhibition of hepatic lipase. *J. Lipid Res*. 2002 déc;43(12):2136–45.
6. Berbée JFP, van der Hoogt CC, Sundararaman D, Havekes LM, Rensen PCN. Severe hypertriglyceridemia in human APOC1 transgenic mice is caused by apoC-I-induced inhibition of LPL. *J. Lipid Res*. 2005 févr;46(2):297–306.
7. Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem*. 1990 juin 25;265(18):10771–9.
8. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem*. 1990 déc 25;265(36):22453–9.
9. Windler E, Havel RJ. Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J. Lipid Res*. 1985 mai;26(5):556–65.
10. Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J. Biol. Chem*. 1991 sept 25;266(27):18259–67.
11. Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, Lauer SJ, Taylor JM. Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J. Biol. Chem*. 1991 mai 15;266(14):8651–4.
12. Shachter NS, Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Breslow JL, Ginsberg HN, et al. Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C-I. *J. Clin. Invest*. 1996 août 1;98(3):846–55.

13. Jong MC, Dahlmans VE, van Gorp PJ, van Dijk KW, Breuer ML, Hofker MH, et al. In the absence of the low density lipoprotein receptor, human apolipoprotein C1 overexpression in transgenic mice inhibits the hepatic uptake of very low density lipoproteins via a receptor-associated protein-sensitive pathway. *J. Clin. Invest.* 1996 nov 15;98(10):2259–67.
14. Jong MC, Gijbels MJ, Dahlmans VE, Gorp PJ, Koopman SJ, Ponc M, et al. Hyperlipidemia and cutaneous abnormalities in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J. Clin. Invest.* 1998 janv 1;101(1):145–52.
15. Jong MC, van Dijk KW, Dahlmans VE, Van der Boom H, Kobayashi K, Oka K, et al. Reversal of hyperlipidaemia in apolipoprotein C1 transgenic mice by adenovirus-mediated gene delivery of the low-density-lipoprotein receptor, but not by the very-low-density-lipoprotein receptor. *Biochem. J.* 1999 mars 1;338 (Pt 2):281–7.
16. Gautier T, Masson D, de Barros JP, Athias A, Gambert P, Aunis D, et al. Human apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity. *J. Biol. Chem.* 2000 déc 1;275(48):37504–9.
17. Gautier T, Masson D, Jong MC, Duverneuil L, Le Guern N, Deckert V, et al. Apolipoprotein CI deficiency markedly augments plasma lipoprotein changes mediated by human cholesteryl ester transfer protein (CETP) in CETP transgenic/ApoCI-knocked out mice. *J. Biol. Chem.* 2002 août 30;277(35):31354–63.
18. Gautier T, Masson D, Jong MC, Pais de Barros J-P, Duverneuil L, Le Guern N, et al. Apolipoprotein CI overexpression is not a relevant strategy to block cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity in CETP transgenic mice. *Biochem. J.* 2005 janv 1;385(Pt 1):189–95.
19. Dumont L, Gautier T, de Barros J-PP, Laplanche H, Blache D, Ducoroy P, et al. Molecular mechanism of the blockade of plasma cholesteryl ester transfer protein by its physiological inhibitor apolipoprotein CI. *J. Biol. Chem.* 2005 nov 11;280(45):38108–16.
20. de Barros J-PP, Boualam A, Gautier T, Dumont L, Vergès B, Masson D, et al. Apolipoprotein CI is a physiological regulator of cholesteryl ester transfer protein activity in human plasma but not in rabbit plasma. *J. Lipid Res.* 2009 sept;50(9):1842–51.
21. Pillois X, Gautier T, Bouillet B, Pais de Barros J-P, Jeannin A, Vergès B, et al. Constitutive inhibition of plasma CETP by apolipoprotein C1 is blunted in dyslipidemic patients with coronary artery disease. *J. Lipid Res.* 2012 juin;53(6):1200–9.
22. Berbée JFP, Mooijaart SP, de Craen AJM, Havekes LM, van Heemst D, Rensen PCN, et al. Plasma apolipoprotein CI protects against mortality from infection in old age. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008 févr;63(2):122–6.
23. Schmitt A, Schmitt J, Münch G, Gasic-Milencovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Anal. Biochem.* 2005 mars 15;338(2):201–15.

24. Tournier JF, Bayard F, Tauber JP. Rapid purification and activity of apolipoprotein C1 on the proliferation of bovine vascular endothelial cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1984 juin 19;804(2):216–20.
25. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985 oct;150(1):76–85.
26. Sparks DL, Phillips MC. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J. Lipid Res.* 1992 janv;33(1):123–30.
27. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972 juin;18(6):499–502.
28. Dautin G, Soltani Z, Ducloux D, Gautier T, Pais de Barros JP, Gambert P, et al. Hemodialysis reduces plasma apolipoprotein C-I concentration making VLDL a better substrate for lipoprotein lipase. *Kidney Int.* 2007 oct;72(7):871–8.
29. Zeller M, Masson D, Farnier M, Lorgis L, Deckert V, Pais de Barros J-P, et al. High serum cholesteryl ester transfer rates and small high-density lipoproteins are associated with young age in patients with acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007 nov 13;50(20):1948–55.
30. Guyard-Dangremont V, Lagrost L, Gambert P, Lallemand C. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay of the human cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Clin. Chim. Acta.* 1994 déc 16;231(2):147–60.
31. de Vries R, Perton FG, Dallinga-Thie GM, van Roon AM, Wolffenbuttel BHR, van Tol A, et al. Plasma cholesteryl ester transfer is a determinant of intima-media thickness in type 2 diabetic and nondiabetic subjects: role of CETP and triglycerides. *Diabetes.* 2005 déc;54(12):3554–9.
32. Nishida HI, Arai H, Nishida T. Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 1993 août 5;268(22):16352–60.
33. Masson D, Athias A, Lagrost L. Evidence for electronegativity of plasma high density lipoprotein-3 as one major determinant of human cholesteryl ester transfer protein activity. *J. Lipid Res.* 1996 juill;37(7):1579–90.
34. Sammett D, Tall AR. Mechanisms of enhancement of cholesteryl ester transfer protein activity by lipolysis. *J. Biol. Chem.* 1985 juin 10;260(11):6687–97.
35. Desrumaux C, Athias A, Masson D, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L. Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipid transfer protein. *J. Lipid Res.* 1998 janv;39(1):131–42.
36. Colhoun HM, Scheek LM, Rubens MB, Van Gent T, Underwood SR, Fuller JH, et al. Lipid transfer protein activities in type 1 diabetic patients without renal failure and nondiabetic control subjects and their association with coronary artery calcification. *Diabetes.* 2001 mars;50(3):652–9.

37. Dullaart RP, Groener JE, Dikkeschei BD, Erkelens DW, Doorenbos H. Elevated cholesteryl ester transfer protein activity in IDDM men who smoke. Possible factor for unfavorable lipoprotein profile. *Diabetes Care*. 1991 avr;14(4):338–41.
38. Dullaart RP, Groener JE, Dikkeschei LD, Erkelens DW, Doorenbos H. Increased cholesteryl ester transfer activity in complicated type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus--its relationship with serum lipids. *Diabetologia*. 1989 janv;32(1):14–9.
39. Bagdade JD, Lane JT, Subbaiah PV, Otto ME, Ritter MC. Accelerated cholesteryl ester transfer in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1993 déc;104(1-2):69–77.
40. Riemens S, van Tol A, Sluiter W, Dullaart R. Elevated plasma cholesteryl ester transfer in NIDDM: relationships with apolipoprotein B-containing lipoproteins and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis*. 1998 sept;140(1):71–9.

Figure 1. Effect of methylglyoxal on isoelectrophoretic charge of apoC1 and on its ability to inhibit CETP.

- A- 50 µg of apoC1 treated or not treated with methylglyoxal (0, 10, 25, 50, 100 or 500 nmol, corresponding to a ratio of 0:1, 0.1:1, 0.25:1, 0.5:1, 1:1 and 5:1 of apoC1 reactive groups) were isoelectrofocused as described under “Materials and Methods”. A mixture of pI markers (pI 3-10) was applied in the bottom line.
- B- Purified human CETP (5 µl) was incubated with apoC1 (1 µM) treated with 0, 10, 25, 50, 100 and 500 nmol of methylglyoxal. CETP activity was expressed as compared with CETP activity measured without apoC1, which represents 100%.*** as significantly different from control, p<0.0001

Figure 2. Effect of methylglyoxal on electronegative charge of HDL and on their ability to be a substrate for CETP

- A- Human HDLs were isolated by ultracentrifugation. 23 mg of native HDLs or mixtures containing 23 mg of HDLs with various amounts of MG (7.07, 28.28 and 141 µmol corresponding to a ratio of 0:1, 0.25:1, 1:1 and 5:1 of HDL reactive groups) were incubated for 1h in PBS at room temperature. Subsequently, 5 µl of the mixtures were subjected to electrophoresis in 0.5% agarose gel. Sudan Black-Stained gel shows a typical migration pattern.
- B- Purified CETP and donor liposomes were incubated with native HDLs or with HDLs treated with methylglyoxal. Percentage of CETP activity was calculated by comparing the initial transfer rate with native HDL with HDL treated with MG. * as significantly different from control, p<0.001

Figure 3. Differences in isoelectrophoretic pI distribution of apoC1 in controls (n=6) and T1D patients (n=6).

Isoelectrofocalisation was conducted as described in Methods. The distribution of isoelectric points (pI) between 3 and 10 was divided into 5 ranges according to pI markers. Following incubation with anti-apoC1, band intensity of immunoblots developed with an ECL kit (Thermo Scientific) was normalized to total intensity of the strip and expressed as a percentage for each range. Analysis was performed using Image Lab software (Bio Rad).

Figure 1 A

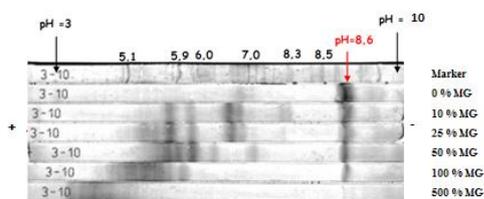


Figure 1 B

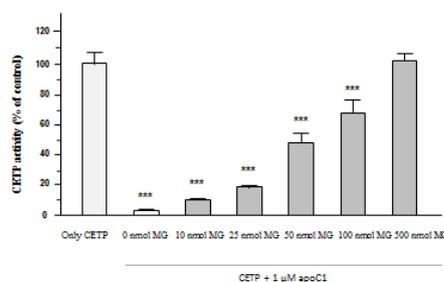


Figure 2 A

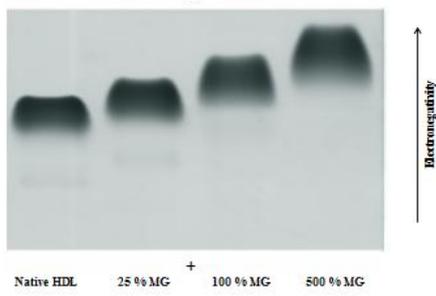


Figure 2 B

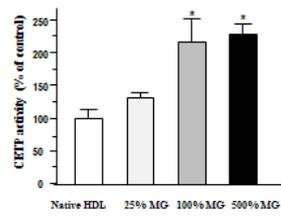


Figure 3

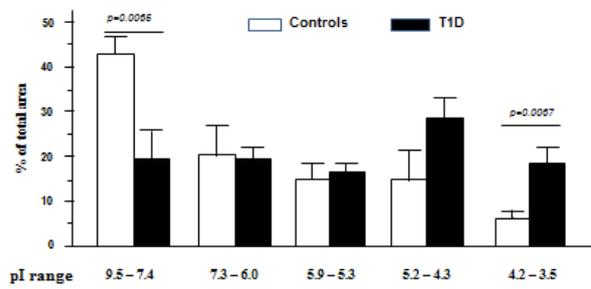


Figure 4. Relationship between apoC1 concentration and CETP activity in controls (A), T1D patients (B) and T2D patients (C).
Correlation coefficients were calculated by Pearson test.

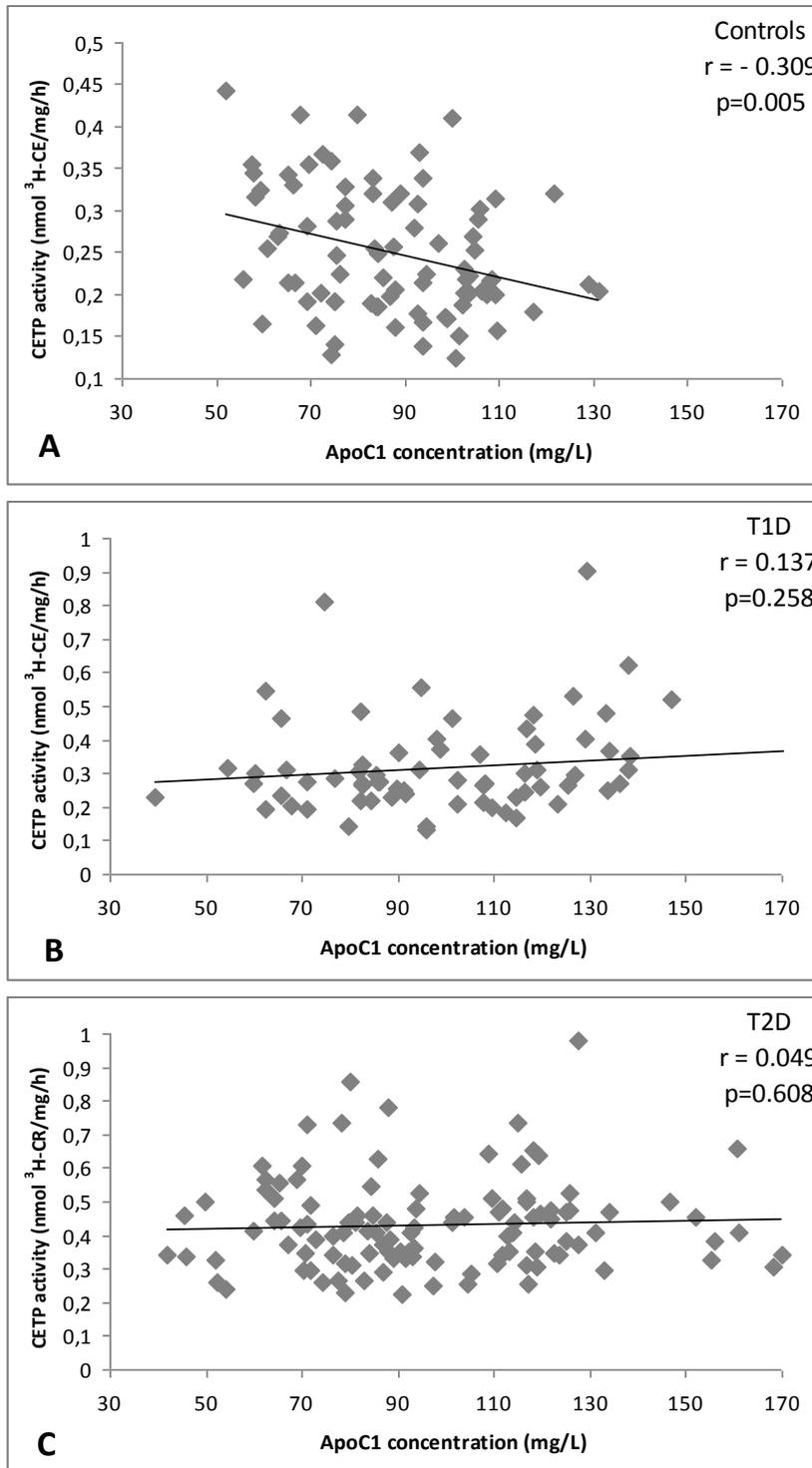


Table 1. Characteristics of study population

	Controls	T1D patients	T2D patients
	n=83	n=70	n=113
Age (yr)	43.07 ± 14.22	42.1 ± 15.9	59.34 ± 9.48 ^{c, f}
Gender M [n (%)]	47 (57)	39 (56)	61 (54)
Weight (kg)	68.3 ± 11.37	74.59 ± 16.49 ^a	96.67 ± 20.38 ^{c, f}
BMI	23.58 ± 3.67	25.66 ± 5.34 ^a	34.81 ± 7.01 ^{c, f}
Statin [n (%)]	0 (0)	18 (25.7)	57 (50.4)
Duration of diabetes (yr)		20 ± 12.5	12.7 ± 9.5
Retinopathy [n (%)]		36 (51.4)	34 (30)
Nephropathy [n (%)]			
Stage 0		53/68 (77.9)	51/109 (46.8)
Stage 1		10/68 (14.7)	41/109 (37.6)
Stage 2		5/68 (7.4)	17/109 (15.6)
Treatment of diabetes [n (%)]			
OAD		2 (2.9)	97 (85.8)
Metformin		2 (2.9)	69 (61.1)
Sulphonylureas		0 (0)	69 (61.1)
α-glucosidase inhibitors		0 (0)	2 (1.8)
DPP4-inhibitors		0 (0)	12 (10.6)
GLP1 agonists		0 (0)	8 (7.1)
Insulin therapy		70 (100)	65 (53.7)
Long acting		0 (0)	37 (32.7)
Long acting + Short acting		61 (87.1)	28 (24.8)
Pump therapy		9 (12.9)	0 (0)
Insulin-OAD combination		2 (2.9)	51 (45.1)
Glycemia (mmol/l)	5.24 ± 0.44	9.69 ± 4.41 ^c	10.25 ± 4.2 ^c
HbA1C (%)	ND	8.7 ± 1.76	8.77 ± 1.76
(mmol/mol)		72 ± 0.21	72 ± 0.21
Creatinine (μmol /l)	86.42 ± 13.63	78.3 ± 37.37	90.07 ± 29.28
Total cholesterol (mmol/l)	4.72 ± 0.89	4.94 ± 1.26	4.74 ± 1.18
LDL-C (mmol/l)	3.06 ± 0.71	2.84 ± 1.05	2.74 ± 0.94 ^a
HDL-C (mmol/l)	1.48 ± 0.41	1.62 ± 0.46	1.08 ± 0.25 ^{c, f}
Triglycerides (mmol/l)	0.86 ± 0.24	1.16 ± 0.77 ^a	2.34 ± 1.79 ^{c, f}
ApoC1 mass (mg/l)	86.53 ± 18.01	100.87 ± 27.58 ^c	96.7 ± 28.28 ^a
CETP activity (nmol ³ H-CE/mg/h)	0.25 ± 0.075	0.32 ± 0.142 ^c	0.43 ± 0.135 ^{c, f}

Otherwise specified, values are mean ± SD

^{a, b, c} Significantly different from control, p<0.01, p<0.001, p<0.0001, respectively

^{d, e, f} Significantly different from type 1 diabetes, p<0.01, p<0.001, p<0.0001, respectively

OAD: oral antidiabetic drug

Table 2. Correlations between CETP activity and age, BMI, glycemia, HbA1C, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, TG and ApoC1 in control subjects, T1D and T2D patients.

	CETP activity (nmol ³ H-CE/mg/h)	
	r	p
Controls (n=83)		
Age		
BMI	0.110	0.323
Total cholesterol	0.062	0.577
LDL-C	0.042	0.705
HDL-C	0.135	0.225
TG	- 0.163	0.141
ApoC1	0.176	0.112
	- 0.309	0.005
T1D patients (n=70)		
Age		
BMI	- 0.279	0.019
HbA1C	0.199	0.098
Total cholesterol	0.392	0.001
LDL-C	0.192	0.114
HDL-C	0.279	0.02
TG	- 0.418	<0.0001
ApoC1	0.460	<0.0001
	0.137	0.258
T1D patients with TG<1.7 mmol/l (n=58)		
Age		
BMI	-0.275	0.037
HbA1C	0.259	0.05
Total cholesterol	0.285	0.03
LDL-C	0.174	0.192
HDL-C	0.245	0.064
TG	-0.181	0.174
ApoC1	0.121	0.366
	0.128	0.339
T2D patients (n=113)		
Age		
BMI	- 0.072	0.446
HbA1C	- 0.020	0.831
Total cholesterol	0.143	0.134
LDL-C	0.271	0.004
HDL-C	0.194	0.04
TG	- 0.428	<0.0001
ApoC1	0.386	<0.0001
	0.049	0.608

Table 3. Analyses of contributing factors for CETP activity (Multiple linear regression analysis)

		CETP activity (nmol ³ H-CE/mg/h)		
		β	T	p value
Controls	Age	0.102	0.973	0.334
	BMI	0.078	0.743	0.459
	ApoC1	-0.364	-3.460	0.001
	HDL-C	-0.021	-0.191	0.849
	LDL-C	0.117	1.068	0.289
	TG	0.255	2.423	0.018
T1D patients	Age	-0.119	-1.014	0.314
	BMI	0.077	0.760	0.450
	HbA1C	0.240	2.339	0.022
	ApoC1	-0.049	-0.483	0.631
	HDL-C	-0.166	-1.570	0.121
	LDL-C	0.101	0.900	0.372
	TG	0.411	4.057	<0.0001
	Statin	-0.295	-3.002	0.004
T1D patients with TG <1.7 mmol/l	Age	-0.113	-0.761	0.450
	BMI	0.286	2.377	0.021
	HbA1C	0.274	2.256	0.028
	ApoC1	0.08	0.654	0.516
	HDL-C	-0.078	-0.620	0.538
	LDL-C	0.135	1.054	0.297
	TG	0.153	1.175	0.245
	Statin	-0.250	-2.067	0.044
T2D patients	Age	0.114	1.318	0.191
	BMI	0.057	0.695	0.488
	HbA1C	0.004	0.044	0.965
	ApoC1	-0.143	-1.612	0.110
	HDL-C	-0.345	-3.507	0.001
	LDL-C	0.204	2.389	0.019
	TG	0.249	2.467	0.015
	Statin	-0.008	-0.093	0.926

Non-normally distributed data were log-transformed before being entered into the multiple linear regression analysis

5- Discussion

Nous avons donc montré dans cette étude, que la glycation *in vitro* de l'apoC1 était responsable d'une modification de ses propriétés électrostatiques et d'une perte de sa capacité à inhiber la CETP. Nous avons également mis en évidence *in vivo*, que les propriétés électrostatiques de l'apoC1 étaient modifiées chez les patients diabétiques de type 1 et pour la première fois que l'apoC1 n'était pas capable d'inhiber la CETP chez des sujets diabétiques de type 1 et 2.

Nous avons voulu déterminer l'effet de la glycation *in vitro* de l'apoC1 sur sa charge électrostatique et sur son potentiel inhibiteur de la CETP. Pour cela, l'apoC1 a été glyquée avec du méthylglyoxal (MGO), qui interagit avec les résidus lysine et arginine des protéines pour former des bases de Schiff (393) et diminuer ainsi le point isoélectrique des protéines. Comme prévu, la glycation par le MGO entraînait une modification notable du point isoélectrique de l'apoC1 et ce de manière dose dépendante. La glycation de l'apoC1 avec des quantités croissantes de MGO était associée à la fois à une diminution de son électropositivité et à une perte progressive de sa capacité d'inhibition de la CETP. Ces résultats sont concordants avec les études *in vitro* au cours desquelles l'acétylation des résidus lysine de l'apoC1 accompagnait d'une réduction de sa charge électropositive et d'une baisse de sa capacité d'inhibition du transfert des esters de cholestérol induit par la CETP (317).

De plus, nous avons montré que la glycation des HDL par le MGO les rendait plus électronégatives, alors que cette électronégativité est un déterminant majeur de la liaison CETP-HDL. La glycation des acides aminés chargés positivement de l'apoC1 responsable d'une baisse de l'électropositivité de l'apoC1 peut expliquer pourquoi les HDL glyquées étaient plus électronégatives et présentaient ainsi une plus faible capacité à inhiber l'activité CETP.

Dans la mesure où la glycation est une des conséquences de l'hyperglycémie observée au cours du diabète, nous avons émis l'hypothèse que les propriétés électrostatiques de l'apoC1 de patients diabétiques pouvaient être différentes de celles de l'apoC1 de patients normolipidémiques-normoglycémiques. L'isoélectrophorèse menée *in vivo* dans notre étude, nous a permis de montrer que la charge électrostatique de l'apoC1 était modifiée chez des patients diabétiques de type 1 en comparaison à celle de sujets témoins.

En effet, l'apoC1 des patients diabétiques de type 1 était significativement moins basique que celle des sujets contrôles. La glycation *in vitro* de l'apoC1 par le MGO entraînait une modification de son point isoélectrique similaire à celle observée *in vivo* chez les patients

diabétiques de type 1. Une diminution de l'ordre de 50% de la principale bande d'apoC1 (pI entre 7,4 et 9,5) était observée pour la première fois chez les patients diabétiques de type 1. De même, une réduction de l'ordre de 50% de la bande du pI situé entre 7,4 et 9,5 était mise en évidence lorsque l'apoC1 était traité avec 50% de MGO.

L'ensemble de ces données nous a permis de penser que la fonctionnalité de l'apoC1, inhibiteur physiologique de la CETP, pouvait être altérée au cours du diabète. Nous avons donc étudié les relations entre l'activité CETP et la concentration plasmatique en apoC1 chez des patients diabétiques de type 1 et de type 2 et chez des sujets normolipidémiques-normoglycémiques.

Nous avons mis en évidence, comme cela avait déjà été rapporté (321), une corrélation négative significative entre la concentration plasmatique en apoC1 et l'activité CETP chez les témoins normolipidémiques-normoglycémiques. Cette donnée confirme que l'apoC1 est un inhibiteur physiologique de la CETP. Un de nos principaux résultats est l'absence de capacité d'inhibition de l'apoC1 sur l'activité CETP chez les sujets diabétiques de type 1 et de type 2, caractérisée par la perte de corrélation entre l'activité CETP et la concentration plasmatique en apoC1 dans cette population.

L'hyperglycémie, principale anomalie commune au diabète de type 1 et de type 2, peut être responsable de cette perte du potentiel inhibiteur. L'association positive indépendante entre l'activité CETP et l'hémoglobine glyquée (HbA1C) observée chez les patients diabétiques de type 1 va dans ce sens. De plus, l'activité CETP du quartile de patients diabétiques de type 1 avec l'HbA1C la plus élevée était significativement plus haute que celle du quartile de diabétiques de type 1 avec l'HbA1C la plus basse. Il semble ainsi que plus l'hyperglycémie est importante, plus la perte du potentiel inhibiteur de l'apoC1 est prononcée.

Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation significative entre l'activité CETP et l'HbA1C chez les patients diabétiques de type 2. Mais il semble que l'hypertriglycémie, très fréquente dans cette population, a un effet majeur sur l'activité CETP, qui peut ainsi vraisemblablement masquer l'effet de l'hyperglycémie sur l'activité CETP.

Nous avons également montré que l'activité CETP à la fois chez les diabétiques de type 1 et de type 2 était plus élevée que celle des témoins, ce qui est concordant avec la littérature (205,207,394–396). De plus, l'activité CETP était significativement plus élevée chez les patients diabétiques de type 2 que chez les patients diabétiques de type 1. Cette différence peut s'expliquer en partie par un taux de triglycrides plus de 2 fois supérieure chez les diabétiques, qui va directement stimuler l'activité CETP. La forte association indépendante

entre l'activité CETP et le taux de TG observée chez les diabétiques de type 2 renforce le fait que l'hypertriglycéridémie est déterminant majeur de l'activité CETP, ce qui a déjà été mis en évidence (132).

Chez les diabétiques de type 1, même si le taux de TG est dans les valeurs normales, il reste supérieur à celui des sujets contrôles et est corrélé significativement à l'activité CETP. Nous avons donc isolé les diabétiques de type 1 avec un taux de TG normal, inférieur à 1,7 mmol/L. Nous avons pu observer que l'activité CETP au sein de cette population était significativement plus élevée que celle des témoins, alors que les taux de TG de ces 2 groupes n'étaient pas statistiquement différents. De plus, chez ces diabétiques de type 1 avec un taux de TG < 1,7 mmol/L, il n'existait pas de corrélation entre l'activité CETP et les TG. Ainsi, la plus forte capacité de la CETP à échanger les esters de cholestérol chez les patients diabétiques de type 1 est probablement liée à d'autres mécanismes que l'hypertriglycéridémie, comme l'hyperglycémie. Ainsi, l'hyperglycémie, via l'HbA1C, était corrélée à l'activité CETP à la fois en analyse univariée et multivariée chez les patients diabétiques de type 1.

Nous avons mis en évidence une élévation significative de la concentration plasmatique en apoC1 chez les patients diabétiques de type 1 et 2 en comparaison aux sujets contrôles. Même si les mécanismes à l'origine de cette augmentation restent inconnus, l'augmentation de l'activité CETP observée chez les patients diabétiques survient alors que la concentration en apoC1 est majorée, ce qui renforce le fait que l'apoC1 est dysfonctionnelle au sein de cette population.

Nous pouvons supposer que la population diabétique pourrait être une cible privilégiée des inhibiteurs de la CETP. En effet, les inhibiteurs de la CETP pourraient permettre de réguler l'activité CETP, qui ne l'est plus physiologiquement du fait de la dysfonction de l'apoC1, liée à sa glycation. Cependant, il est nécessaire de rappeler qu'une activité CETP résiduelle semble être nécessaire pour préserver les propriétés anti-athérogènes associées à l'action physiologique de la CETP (131). Villard (135) propose ainsi une fourchette d'activité CETP optimale située entre 22 et 34% représentant la future cible thérapeutique pour l'activité CETP endogène chez les patients avec des anomalies métaboliques et à haut risque cardio-vasculaire.

En conclusion, nous avons montré que la glycation in vitro de l'apoC1 entraînait une diminution de capacité à inhiber l'activité CETP. Nous suggérons que la glycation de l'apoC1, qui modifie ses propriétés électrostatiques et par conséquent la charge électrostatique des

HDL, conduit à une augmentation de la liaison entre la CETP et les HDL et donc à une augmentation du transfert des esters de cholestérol et de l'activité CETP.

Nous avons également démontré *in vivo* que les propriétés électrostatiques de l'apoC1 étaient modifiées chez des patients diabétiques de type 1 et que l'apoC1 des patients diabétiques de type 1 et 2 avait perdu sa capacité d'inhibition de la CETP. L'hyperglycémie joue un rôle majeur dans cette perte du potentiel inhibiteur de l'apoC1.

CONCLUSION

Nous avons confirmé au cours de ces deux études menées *in vivo* chez l'homme, que l'apoC1 était un inhibiteur physiologique de l'activité CETP en condition de normoglycémie. Ce potentiel inhibiteur est observé aussi bien chez des sujets sains que chez des sujets aux antécédents de coronaropathie.

En revanche, nous avons démontré, pour la première fois, que l'apoC1 perdait sa capacité d'inhibition de l'activité CETP en cas d'hyperlipidémie au sein d'une population de patients coronariens, mais aussi au cours du diabète de type 1 et de type 2.

Au cours de l'hyperlipidémie, l'abondance en lipoprotéines riches en triglycérides, accepteurs préférentiels des esters de cholestérol des HDL, stimule la réaction de transfert des esters de cholestérol induite par la CETP, ce qui peut expliquer l'absence d'impact de l'apoC1 sur l'activité CETP. En outre, nous avons démontré que le taux plasmatique de triglycérides est corrélé positivement avec l'apoC1 liée aux VLDL. Or, l'apoC1 liée aux VLDL ne possède pas de capacité d'inhibition de l'activité CETP, contrairement à l'apoC1 liée aux HDL. Il semble donc que la répartition de l'apoC1 entre les HDL et les VLDL qui pourrait être modifiée par l'hyperlipidémie (247) influence le potentiel inhibiteur de l'apoC1 sur l'activité CETP.

Au cours du diabète, nous avons démontré *in vitro* que la glycation de l'apoC1 modifiait ses propriétés électrostatiques, facteur déterminant de sa capacité d'inhibition de la CETP, et altérait sa capacité d'inhibition de l'activité CETP. Ces données ont été confirmées *in vivo*. Ainsi, nous avons mis en évidence une modification de la charge électrostatique de l'apoC1 au cours du diabète. L'hyperglycémie, responsable de la glycation au cours du diabète joue un rôle certain dans la perte du potentiel inhibiteur de l'apoC1 et explique en partie l'élévation de l'activité CETP observée au cours du diabète de type 1 et 2.

Des études complémentaires sont nécessaires pour affiner la compréhension de la dysfonctionnalité de l'apoC1 notamment au cours du diabète.

PERSPECTIVES

Nous envisageons de mettre en œuvre trois axes d'études pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au caractère dysfonctionnel de l'apoC1 au cours du diabète.

Le premier axe consiste à étudier la répartition de l'apoC1 sur les VLDL et les HDL et son impact sur la capacité d'inhibition de l'apoC1 à inhiber l'activité CETP. Nous avons montré que l'apoC1 liée aux HDL présentait une capacité d'inhibition de la CETP ce qui n'était pas le cas pour l'apoC1 liée aux VLDL. Or, nous avons mené des travaux préliminaires qui semblent montrer que la répartition de l'apoC1 entre HDL et VLDL est modifiée chez les patients diabétiques avec une augmentation de l'apoC1 liée aux VLDL, ce qui pourrait expliquer en partie le caractère dysfonctionnel de l'apoC1 des sujets diabétiques. Cette expérimentation nécessite la mise au point d'une technique permettant de séparer les lipoprotéines sans ultracentrifugation risque de détacher l'apoC1 des lipoprotéines et de fausser les dosages.

Le deuxième axe concerne l'étude de l'effet de l'amélioration de l'équilibre glycémique sur la perte d'inhibition de l'apoC1 sur l'activité CETP au cours du diabète de type 1 et de type 2. Nous envisageons de recruter des patients diabétiques avec un équilibre glycémique médiocre et d'étudier la capacité de leur apoC1 à inhiber la CETP avant et après amélioration de leur équilibre glycémique.

Enfin, le troisième axe consiste à comparer l'apoC1 de sujets diabétiques et de sujets sains par des méthodes de protéomique, notamment le MALDI-TOF, avec pour objectif de mettre en évidence chez les diabétiques des isoformes pouvant correspondre à la glycation ou à l'oxydation de l'apoC1. Nous avons vu que de nouvelles isoformes de l'apoC1 ont été mises en évidence par spectrométrie de masse chez des sujets coronariens (390) ainsi qu'une oxydation de l'apoC1 par MALDI-TOF (391). Nous envisageons d'utiliser cette technique chez des patients diabétiques. La mise en évidence de formes glyquées de l'apoC1 chez des patients diabétiques pourrait renforcer nos résultats sur le rôle de la glycation dans le caractère dysfonctionnel de l'apoC1 au cours du diabète.

BIBLIOGRAPHIE

1. Patsch W, Gotto AM Jr. Apolipoproteins: pathophysiology and clinical implications. *Meth Enzymol.* 1996;263:3-32.
2. Davis HR Jr, Basso F, Hoos LM, Tetzloff G, Lally SM, Altmann SW. Cholesterol homeostasis by the intestine: lessons from Niemann-Pick C1 Like 1 [NPC1L1]. *Atheroscler Suppl.* sept 2008;9(2):77-81.
3. Gordon DA. Recent advances in elucidating the role of the microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein B lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol.* juin 1997;8(3):131-137.
4. Olofsson SO, Asp L, Borén J. The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* août 1999;10(4):341-346.
5. Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol.* avr 2001;12(2):151-157.
6. Zechner R. The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* avr 1997;8(2):77-88.
7. Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S, Anand S, et al. Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* nov 2007;27(11):2450-2455.
8. Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:141-172.
9. Alexander CA, Hamilton RL, Havel RJ. Subcellular localization of B apoprotein of plasma lipoproteins in rat liver. *J Cell Biol.* mai 1976;69(2):241-263.
10. Sabesin SM, Frase S. Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *J Lipid Res.* juill 1977;18(4):496-511.
11. Jiang XC, Bruce C, Mar J, Lin M, Ji Y, Francone OL, et al. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest.* mars 1999;103(6):907-914.
12. Gotto AM Jr, Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Meth Enzymol.* 1986;128:3-41.
13. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 4 avr 1986;232(4746):34-47.

14. Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, et al. 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*. 15 déc 1993;90(24):11603-11607.
15. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 2 mai 1997;89(3):331-340.
16. Hua X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics*. 10 févr 1995;25(3):667-673.
17. Towle HC. Metabolic regulation of gene transcription in mammals. *J Biol Chem*. 6 oct 1995;270(40):23235-23238.
18. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, et al. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. 8 oct 1993;75(1):187-197.
19. Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M, Sato R. Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 28 sept 2001;276(39):36431-36437.
20. Miura H, Tomoda H, Miura K, Takishima K, Omura S. Lactacystin increases LDL receptor level on HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 23 oct 1996;227(3):684-687.
21. Lambert G, Ancellin N, Charlton F, Comas D, Pilot J, Keech A, et al. Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clin Chem*. juin 2008;54(6):1038-1045.
22. Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J Lipid Res*. juin 2008;49(6):1303-1311.
23. Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 4 mai 2004;101(18):7100-7105.
24. Park SW, Moon Y-A, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem*. 26 nov 2004;279(48):50630-50638.
25. Maxwell KN, Fisher EA, Breslow JL. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 8 févr 2005;102(6):2069-2074.

26. Lalanne F, Lambert G, Amar MJA, Chétiveaux M, Zair Y, Jarnoux A-L, et al. Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J Lipid Res.* juin 2005;46(6):1312-1319.
27. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci USA.* 12 avr 2005;102(15):5374-5379.
28. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet.* sept 2006;79(3):514-523.
29. Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, Burnett JR. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis.* août 2007;193(2):445-448.
30. Lambert G, Jarnoux A-L, Pineau T, Pape O, Chetiveaux M, Laboisce C, et al. Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology.* oct 2006;147(10):4985-4995.
31. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, Seidah NG. The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem.* 13 oct 2006;281(41):30561-30572.
32. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest.* nov 2006;116(11):2995-3005.
33. Zhang D-W, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem.* 22 juin 2007;282(25):18602-18612.
34. Bottomley MJ, Cirillo A, Orsatti L, Ruggeri L, Fisher TS, Santoro JC, et al. Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants. *J Biol Chem.* 9 janv 2009;284(2):1313-1323.
35. Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, Sehayek E, Breslow JL. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res.* nov 2003;44(11):2109-2119.
36. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 14 oct 2003;100(21):12027-12032.

37. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* août 2004;24(8):1454-1459.
38. Jeong HJ, Lee H-S, Kim K-S, Kim Y-K, Yoon D, Park SW. Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res.* févr 2008;49(2):399-409.
39. Dong B, Wu M, Li H, Kraemer FB, Adeli K, Seidah NG, et al. Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1alpha and SREBP2: mechanism for the resistance to LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters. *J Lipid Res.* juin 2010;51(6):1486-1495.
40. Li H, Dong B, Park SW, Lee H-S, Chen W, Liu J. Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *J Biol Chem.* 16 oct 2009;284(42):28885-28895.
41. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* 26 janv 1996;271(5248):518-520.
42. Williams DL, Connelly MA, Temel RE, Swarnakar S, Phillips MC, de la Llera-Moya M, et al. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol.* août 1999;10(4):329-339.
43. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res.* mars 1968;9(2):155-167.
44. Alpers DH, Lock DR, Lancaster N, Poksay K, Schonfeld G. Distribution of apolipoproteins A-I and B among intestinal lipoproteins. *J Lipid Res.* janv 1985;26(1):1-10.
45. Rothblat GH, Bamberger M, Phillips MC. Reverse cholesterol transport. *Meth Enzymol.* 1986;129:628-644.
46. Hayden MR, Clee SM, Brooks-Wilson A, Genest J Jr, Attie A, Kastelein JJ. Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Curr Opin Lipidol.* avr 2000;11(2):117-122.
47. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res.* mai 1999;40(5):781-796.
48. Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest.* sept 2001;108(6):793-797.

49. Van Eck M, Pennings M, Hoekstra M, Out R, Van Berkel TJ. Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* juin 2005;16(3):307-315.
50. Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab.* mai 2008;7(5):365-375.
51. Cooke CJ, Nanjee MN, Stepanova IP, Olszewski WL, Miller NE. Variations in lipid and apolipoprotein concentrations in human leg lymph: effects of posture and physical exercise. *Atherosclerosis.* mars 2004;173(1):39-45.
52. Nanjee MN, Cooke CJ, Olszewski WL, Miller NE. Concentrations of electrophoretic and size subclasses of apolipoprotein A-I-containing particles in human peripheral lymph. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* sept 2000;20(9):2148-2155.
53. Nanjee MN, Cooke CJ, Olszewski WL, Miller NE. Lipid and apolipoprotein concentrations in prenodal leg lymph of fasted humans. Associations with plasma concentrations in normal subjects, lipoprotein lipase deficiency, and LCAT deficiency. *J Lipid Res.* août 2000;41(8):1317-1327.
54. Nanjee MN, Cooke CJ, Wong JS, Hamilton RL, Olszewski WL, Miller NE. Composition and ultrastructure of size subclasses of normal human peripheral lymph lipoproteins: quantification of cholesterol uptake by HDL in tissue fluids. *J Lipid Res.* avr 2001;42(4):639-648.
55. Martel C, Li W, Fulp B, Platt AM, Gautier EL, Westerterp M, et al. Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest.* 1 avr 2013;123(4):1571-1579.
56. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 15 déc 2000;1529(1-3):245-256.
57. Funke H, von Eckardstein A, Pritchard PH, Karas M, Albers JJ, Assmann G. A frameshift mutation in the human apolipoprotein A-I gene causes high density lipoprotein deficiency, partial lecithin: cholesterol-acyltransferase deficiency, and corneal opacities. *J Clin Invest.* janv 1991;87(1):371-376.
58. Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, Kastelein J. The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res.* févr 1997;38(2):191-205.
59. Vaisman BL, Klein HG, Rouis M, Bérard AM, Kindt MR, Talley GD, et al. Overexpression of human lecithin cholesterol acyltransferase leads to hyperalphalipoproteinemia in transgenic mice. *J Biol Chem.* 19 mai 1995;270(20):12269-12275.

60. Bérard AM, Föger B, Remaley A, Shamburek R, Vaisman BL, Talley G, et al. High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesterol acyltransferase. *Nat Med.* juill 1997;3(7):744-749.
61. Föger B, Chase M, Amar MJ, Vaisman BL, Shamburek RD, Paigen B, et al. Cholesterol ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J Biol Chem.* 24 déc 1999;274(52):36912-36920.
62. Rader DJ, Jaye M. Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. *Curr Opin Lipidol.* avr 2000;11(2):141-147.
63. Lagrost, Laurent L. relationship of cholesterol ester transfer protein to atherosclerosis. *Plasma Lipids and Their Role in Disease.* 1999. p. 217-231.
64. Mann CJ, Yen FT, Grant AM, Bihain BE. Mechanism of plasma cholesterol ester transfer in hypertriglyceridemia. *J Clin Invest.* déc 1991;88(6):2059-2066.
65. Guérin M, Le Goff W, Lassel TS, Van Tol A, Steiner G, Chapman MJ. Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* févr 2001;21(2):282-288.
66. Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V, Gambert P. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol.* juin 1998;9(3):203-209.
67. Desrumaux C, Deckert V, Athias A, Masson D, Lizard G, Palleau V, et al. Plasma phospholipid transfer protein prevents vascular endothelium dysfunction by delivering alpha-tocopherol to endothelial cells. *FASEB J.* mai 1999;13(8):883-892.
68. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* sept 2001;108(6):785-791.
69. Martinez LO, Jacquet S, Esteve J-P, Rolland C, Cabezon E, Champagne E, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature.* 2 janv 2003;421(6918):75-79.
70. Jacquet S, Malaval C, Martinez LO, Sak K, Rolland C, Perez C, et al. The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci.* nov 2005;62(21):2508-2515.
71. Malaval C, Laffargue M, Barbaras R, Rolland C, Peres C, Champagne E, et al. RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cell Signal.* janv 2009;21(1):120-127.
72. Fabre AC, Malaval C, Ben Addi A, Verdier C, Pons V, Serhan N, et al. P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology.* oct 2010;52(4):1477-1483.

73. Blom D, Yamin T-T, Champy M-F, Selloum M, Bedu E, Carballo-Jane E, et al. Altered lipoprotein metabolism in P2Y(13) knockout mice. *Biochim Biophys Acta*. déc 2010;1801(12):1349-1360.
74. Serhan N, Cabou C, Verdier C, Lichtenstein L, Malet N, Perret B, et al. Chronic pharmacological activation of P2Y13 receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion. *Biochim Biophys Acta*. avr 2013;1831(4):719-725.
75. Pons V, Serhan N, Gayral S, Malaval C, Nauze M, Malet N, et al. Role of the ubiquitin-proteasome system in the regulation of P2Y13 receptor expression: impact on hepatic HDL uptake. *Cell Mol Life Sci*. 13 sept 2013;
76. Cohen DE. Hepatocellular transport and secretion of biliary lipids. *Curr Opin Lipidol*. août 1999;10(4):295-302.
77. Carey MC. Homing-in on the origin of biliary steroids. *Gut*. nov 1997;41(5):721-722.
78. Schwartz CC, Berman M, Vlahcevic ZR, Halloran LG, Gregory DH, Swell L. Multicompartmental analysis of cholesterol metabolism in man. Characterization of the hepatic bile acid and biliary cholesterol precursor sites. *J Clin Invest*. févr 1978;61(2):408-423.
79. Deckelbaum RJ, Lees RS, Small DM, Hedberg SE, Grundy SM. Failure of complete bile diversion and oral bile acid therapy in the treatment of homozygous familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 3 mars 1977;296(9):465-470.
80. Kruit JK, Plösch T, Havinga R, Boverhof R, Groot PHE, Groen AK, et al. Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology*. janv 2005;128(1):147-156.
81. Brown JM, Bell TA 3rd, Alger HM, Sawyer JK, Smith TL, Kelley K, et al. Targeted depletion of hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss. *J Biol Chem*. 18 avr 2008;283(16):10522-10534.
82. Van der Velde AE, Brufau G, Groen AK. Transintestinal cholesterol efflux. *Curr Opin Lipidol*. juin 2010;21(3):167-171.
83. Van der Veen JN, van Dijk TH, Vrans CLJ, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K, et al. Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem*. 17 juill 2009;284(29):19211-19219.
84. Van der Velde AE, Vrans CLJ, van den Oever K, Seemann I, Oude Elferink RPJ, van Eck M, et al. Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. juill 2008;295(1):G203-G208.
85. Brufau G, Kuipers F, Lin Y, Trautwein EA, Groen AK. A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS ONE*. 2011;6(6):e21576.

86. Vrans CLJ, van der Velde AE, van den Oever K, Levels JHM, Huet S, Oude Elferink RPJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux. *J Lipid Res.* oct 2009;50(10):2046-2054.
87. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* avr 2009;29(4):431-438.
88. Hui DY, Labonté ED, Howles PN. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* avr 2008;294(4):G839-843.
89. Le May C, Berger JM, Lespine A, Pillot B, Prieur X, Letessier E, et al. Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2013;33(7):1484-1493.
90. Vrans CLJ, Ottenhoff R, van den Oever K, de Waart DR, Kruyt JK, Zhao Y, et al. Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein. *J Lipid Res.* oct 2012;53(10):2017-2023.
91. Moestrup SK, Kozyraki R. Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Curr Opin Lipidol.* avr 2000;11(2):133-140.
92. Drayna D, Jarnagin AS, McLean J, Henzel W, Kohr W, Fielding C, et al. Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature.* 18 juin 1987;327(6123):632-634.
93. Zhang L, Yan F, Zhang S, Lei D, Charles MA, Cavigliolo G, et al. Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein. *Nat Chem Biol.* avr 2012;8(4):342-349.
94. Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, et al. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature.* 23 nov 1989;342(6248):448-451.
95. Yamashita S, Hui DY, Sprecher DL, Matsuzawa Y, Sakai N, Tarui S, et al. Total deficiency of plasma cholesteryl ester transfer protein in subjects homozygous and heterozygous for the intron 14 splicing defect. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 août 1990;170(3):1346-1351.
96. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.* 1 nov 1990;323(18):1234-1238.
97. Ha YC, Barter PJ. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. *Comp Biochem Physiol, B.* 1982;71(2):265-269.
98. Westerterp M, van der Hoogt CC, de Haan W, Offerman EH, Dallinga-Thie GM, Jukema JW, et al. Cholesteryl ester transfer protein decreases high-density lipoprotein and severely aggravates atherosclerosis in APOE*3-Leiden mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* nov 2006;26(11):2552-2559.

99. Plump AS, Masucci-Magoulas L, Bruce C, Bisgaier CL, Breslow JL, Tall AR. Increased atherosclerosis in ApoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* avr 1999;19(4):1105-1110.
100. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature.* 1 juill 1993;364(6432):73-75.
101. MacLean PS, Bower JF, Vadlamudi S, Osborne JN, Bradfield JF, Burden HW, et al. Cholesteryl ester transfer protein expression prevents diet-induced atherosclerotic lesions in male db/db mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 août 2003;23(8):1412-1415.
102. Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JL, et al. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest.* oct 1995;96(4):2071-2074.
103. Sugano M, Makino N, Sawada S, Otsuka S, Watanabe M, Okamoto H, et al. Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Biol Chem.* 27 févr 1998;273(9):5033-5036.
104. Rittershaus CW, Miller DP, Thomas LJ, Picard MD, Honan CM, Emmett CD, et al. Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* sept 2000;20(9):2106-2112.
105. Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, Minowa T, Maeda K, Shinkai H. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature.* 13 juill 2000;406(6792):203-207.
106. Morehouse LA, Sugarman ED, Bourassa P-A, Sand TM, Zimetti F, Gao F, et al. Inhibition of CETP activity by torcetrapib reduces susceptibility to diet-induced atherosclerosis in New Zealand White rabbits. *J Lipid Res.* juin 2007;48(6):1263-1272.
107. Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, et al. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest.* 15 juin 1996;97(12):2917-2923.
108. Thompson A, Di Angelantonio E, Sarwar N, Erqou S, Saleheen D, Dullaart RPF, et al. Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *JAMA.* 18 juin 2008;299(23):2777-2788.
109. Ridker PM, Paré G, Parker AN, Zee RYL, Miletich JP, Chasman DI. Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: Genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet.* févr 2009;2(1):26-33.

110. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*. 11 août 2012;380(9841):572-580.
111. Clark RW, Ruggeri RB, Cunningham D, Bamberger MJ. Description of the torcetrapib series of cholesteryl ester transfer protein inhibitors, including mechanism of action. *J Lipid Res*. mars 2006;47(3):537-552.
112. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJP, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 22 nov 2007;357(21):2109-2122.
113. Barter P. Lessons learned from the Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) trial. *Am J Cardiol*. 16 nov 2009;104(10 Suppl):10E-5E.
114. Forrest MJ, Bloomfield D, Briscoe RJ, Brown PN, Cumiskey A-M, Ehrhart J, et al. Torcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone. *Br J Pharmacol*. août 2008;154(7):1465-1473.
115. Hu X, Dietz JD, Xia C, Knight DR, Loging WT, Smith AH, et al. Torcetrapib induces aldosterone and cortisol production by an intracellular calcium-mediated mechanism independently of cholesteryl ester transfer protein inhibition. *Endocrinology*. mai 2009;150(5):2211-2219.
116. Clerc RG, Stauffer A, Weibel F, Hainaut E, Perez A, Hoflack J-C, et al. Mechanisms underlying off-target effects of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor torcetrapib involve L-type calcium channels. *J Hypertens*. août 2010;28(8):1676-1686.
117. Connelly MA, Parry TJ, Giardino EC, Huang Z, Cheung W-M, Chen C, et al. Torcetrapib produces endothelial dysfunction independent of cholesteryl ester transfer protein inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*. mai 2010;55(5):459-468.
118. Simic B, Hermann M, Shaw SG, Bigler L, Stalder U, Dörries C, et al. Torcetrapib impairs endothelial function in hypertension. *Eur Heart J*. juill 2012;33(13):1615-1624.
119. Nissen SE, Tardif J-C, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, et al. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*. 29 mars 2007;356(13):1304-1316.
120. Kastelein JJP, van Leuven SI, Burgess L, Evans GW, Kuivenhoven JA, Barter PJ, et al. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 19 avr 2007;356(16):1620-1630.
121. Bots ML, Visseren FL, Evans GW, Riley WA, Revkin JH, Tegeler CH, et al. Torcetrapib and carotid intima-media thickness in mixed dyslipidaemia (RADIANCE 2 study): a randomised, double-blind trial. *Lancet*. 14 juill 2007;370(9582):153-160.

122. Fayad ZA, Mani V, Woodward M, Kallend D, Abt M, Burgess T, et al. Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial. *Lancet*. 29 oct 2011;378(9802):1547-1559.
123. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 29 nov 2012;367(22):2089-2099.
124. Barter PJ, Rye K-A. Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. *J Lipid Res*. sept 2012;53(9):1755-1766.
125. Cannon CP, Shah S, Dansky HM, Davidson M, Brinton EA, Gotto AM, et al. Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N Engl J Med*. 16 déc 2010;363(25):2406-2415.
126. Castro-Perez J, Briand F, Gagen K, Wang S-P, Chen Y, McLaren DG, et al. Anacetrapib promotes reverse cholesterol transport and bulk cholesterol excretion in Syrian golden hamsters. *J Lipid Res*. nov 2011;52(11):1965-1973.
127. Cao G, Beyer TP, Zhang Y, Schmidt RJ, Chen YQ, Cockerham SL, et al. Evacetrapib is a novel, potent, and selective inhibitor of cholesteryl ester transfer protein that elevates HDL cholesterol without inducing aldosterone or increasing blood pressure. *J Lipid Res*. déc 2011;52(12):2169-2176.
128. Nicholls SJ, Brewer HB, Kastelein JJP, Krueger KA, Wang M-D, Shao M, et al. Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: a randomized controlled trial. *JAMA*. 16 nov 2011;306(19):2099-2109.
129. Bell TA 3rd, Graham MJ, Lee RG, Mullick AE, Fu W, Norris D, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of cholesteryl ester transfer protein enhances RCT in hyperlipidemic, CETP transgenic, LDLr^{-/-} mice. *J Lipid Res*. oct 2013;54(10):2647-2657.
130. Niesor EJ, Magg C, Ogawa N, Okamoto H, von der Mark E, Matile H, et al. Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre- β -HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. déc 2010;51(12):3443-3454.
131. Villard EF, El Khoury P, Duchene E, Bonnefont-Rousselot D, Clement K, Bruckert E, et al. Elevated CETP activity improves plasma cholesterol efflux capacity from human macrophages in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. oct 2012;32(10):2341-2349.
132. De Vries R, Perton FG, Dallinga-Thie GM, van Roon AM, Wolffenbuttel BHR, van Tol A, et al. Plasma cholesteryl ester transfer is a determinant of intima-media thickness in type 2 diabetic and nondiabetic subjects: role of CETP and triglycerides. *Diabetes*. déc 2005;54(12):3554-3559.

133. Chapman MJ, Le Goff W, Guerin M, Kontush A. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Eur Heart J.* janv 2010;31(2):149-164.
134. Guerin M, Le Goff W, Duchene E, Julia Z, Nguyen T, Thuren T, et al. Inhibition of CETP by torcetrapib attenuates the atherogenicity of postprandial TG-rich lipoproteins in type IIB hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janv 2008;28(1):148-154.
135. Villard EF, Federspiel M-C, Cherfils C, Fesel-Fouquier V, Bruckert E, Clement K, et al. Endogenous CETP activity as a predictor of cardiovascular risk: determination of the optimal range. *Atherosclerosis.* mars 2013;227(1):165-171.
136. Yvan-Charvet L, Kling J, Pagler T, Li H, Hubbard B, Fisher T, et al. Cholesterol efflux potential and antiinflammatory properties of high-density lipoprotein after treatment with niacin or anacetrapib. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2010;30(7):1430-1438.
137. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Münster study. *Am J Cardiol.* 15 sept 1992;70(7):733-737.
138. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* mai 1977;62(5):707-714.
139. Baseline serum cholesterol and treatment effect in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 20 mai 1995;345(8960):1274-1275.
140. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 6 juill 2002;360(9326):7-22.
141. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet.* 8 oct 2005;366(9493):1267-1278.
142. Olsson AG, Schwartz GG, Szarek M, Sasiela WJ, Ezekowitz MD, Ganz P, et al. High-density lipoprotein, but not low-density lipoprotein cholesterol levels influence short-term prognosis after acute coronary syndrome: results from the MIRACL trial. *Eur Heart J.* mai 2005;26(9):890-896.
143. Ray KK, Cannon CP, Cairns R, Morrow DA, Ridker PM, Braunwald E. Prognostic utility of apoB/AI, total cholesterol/HDL, non-HDL cholesterol, or hs-CRP as predictors of clinical risk in patients receiving statin therapy after acute coronary syndromes: results from PROVE IT-TIMI 22. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mars 2009;29(3):424-430.

144. Mora S, Glynn RJ, Boekholdt SM, Nordestgaard BG, Kastelein JJP, Ridker PM. On-treatment non-high-density lipoprotein cholesterol, apolipoprotein B, triglycerides, and lipid ratios in relation to residual vascular risk after treatment with potent statin therapy: JUPITER (justification for the use of statins in prevention: an intervention trial evaluating rosuvastatin). *J Am Coll Cardiol*. 24 avr 2012;59(17):1521-1528.
145. Wolfram RM, Brewer HB, Xue Z, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, et al. Impact of low high-density lipoproteins on in-hospital events and one-year clinical outcomes in patients with non-ST-elevation myocardial infarction acute coronary syndrome treated with drug-eluting stent implantation. *Am J Cardiol*. 15 sept 2006;98(6):711-717.
146. Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest*. juin 2003;111(12):1795-1803.
147. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 23 mars 2006;354(12):1264-1272.
148. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Stene MCA, Sethi AA, Remaley AT, Schnohr P, et al. Association of loss-of-function mutations in the ABCA1 gene with high-density lipoprotein cholesterol levels and risk of ischemic heart disease. *JAMA*. 4 juin 2008;299(21):2524-2532.
149. Vergès B. [Insulin sensitivity and lipids]. *Diabetes Metab*. avr 2001;27(2 Pt 2):223-227.
150. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes*. juin 1993;42(6):833-842.
151. Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, et al. Effects of insulin and acipimox on VLDL1 and VLDL2 apolipoprotein B production in normal subjects. *Diabetes*. mai 1998;47(5):779-787.
152. Vergès B. Abnormal hepatic apolipoprotein B metabolism in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. août 2010;211(2):353-360.
153. Brunzell JD, Schwartz RS, Eckel RH, Goldberg AP. Insulin and adipose tissue lipoprotein lipase activity in humans. *Int J Obes*. 1981;5(6):685-694.
154. Fried SK, Russell CD, Grauso NL, Brolin RE. Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J Clin Invest*. nov 1993;92(5):2191-2198.
155. Chait A, Bierman EL, Albers JJ. Low-density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts. Mechanism of insulin-induced stimulation. *J Clin Invest*. nov 1979;64(5):1309-1319.
156. Mazzone T, Foster D, Chait A. In vivo stimulation of low-density lipoprotein degradation by insulin. *Diabetes*. avr 1984;33(4):333-338.

157. Ruotolo G, Parlavecchia M, Taskinen MR, Galimberti G, Zoppo A, Le NA, et al. Normalization of lipoprotein composition by intraperitoneal insulin in IDDM. Role of increased hepatic lipase activity. *Diabetes Care*. janv 1994;17(1):6-12.
158. Dullaart RP. Plasma lipoprotein abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Neth J Med*. janv 1995;46(1):44-54.
159. Taskinen MR. Lipoprotein lipase in diabetes. *Diabetes Metab Rev*. avr 1987;3(2):551-570.
160. Weidman SW, Ragland JB, Fisher JN Jr, Kitabchi AE, Sabesin SM. Effects of insulin on plasma lipoproteins in diabetic ketoacidosis: evidence for a change in high density lipoprotein composition during treatment. *J Lipid Res*. janv 1982;23(1):171-182.
161. Marcovecchio ML, Dalton RN, Prevost AT, Acerini CL, Barrett TG, Cooper JD, et al. Prevalence of abnormal lipid profiles and the relationship with the development of microalbuminuria in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. avr 2009;32(4):658-663.
162. Lipid and lipoprotein levels in patients with IDDM diabetes control and complication. Trial experience. The DCCT Research Group. *Diabetes Care*. juill 1992;15(7):886-894.
163. Guy J, Ogden L, Wadwa RP, Hamman RF, Mayer-Davis EJ, Liese AD, et al. Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. *Diabetes Care*. mars 2009;32(3):416-420.
164. Nikkilä EA, Kekki M. Plasma triglyceride transport kinetics in diabetes mellitus. *Metab Clin Exp*. janv 1973;22(1):1-22.
165. Dashti N, Wolfbauer G. Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin. *J Lipid Res*. avr 1987;28(4):423-436.
166. Taskinen MR. Quantitative and qualitative lipoprotein abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes*. oct 1992;41 Suppl 2:12-17.
167. Huttunen JK, Ehnholm C, Kekki M, Nikkilä EA. Postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in normal human subjects: relationship to age, sex and triglyceride metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 1977;82:146-148.
168. Winocour PH, Durrington PN, Ishola M, Anderson DC. Lipoprotein abnormalities in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 24 mai 1986;1(8491):1176-1178.
169. Eckel RH, Albers JJ, Cheung MC, Wahl PW, Lindgren FT, Bierman EL. High density lipoprotein composition in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. févr 1981;30(2):132-138.
170. Kahri J, Groop PH, Viberti G, Elliott T, Taskinen MR. Regulation of apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in IDDM. *Diabetes*. sept 1993;42(9):1281-1288.

171. Selam JL, Kashyap M, Alberti KG, Lozano J, Hanna M, Turner D, et al. Comparison of intraperitoneal and subcutaneous insulin administration on lipids, apolipoproteins, fuel metabolites, and hormones in type I diabetes mellitus. *Metab Clin Exp*. sept 1989;38(9):908-912.
172. Bagdade JD, Dunn FL. Improved lipoprotein surface and core lipid composition following intraperitoneal insulin delivery in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab*. déc 1996;22(6):420-426.
173. Duvillard L, Florentin E, Baillot-Rudoni S, Lalanne-Mistrich M-L, Brun-Pacaud A, Petit J-M, et al. Comparison of apolipoprotein B100 metabolism between continuous subcutaneous and intraperitoneal insulin therapy in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. oct 2005;90(10):5761-5764.
174. Duvillard L, Florentin E, Baillot-Rudoni S, Lalanne-Mistrich M-L, Brun-Pacaud A, Petit J-M, et al. No change in apolipoprotein AI metabolism when subcutaneous insulin infusion is replaced by intraperitoneal insulin infusion in type 1 diabetic patients. *Atherosclerosis*. oct 2007;194(2):342-347.
175. Jensen T, Borch-Johnsen K, Kofoed-Enevoldsen A, Deckert T. Coronary heart disease in young type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with and without diabetic nephropathy: incidence and risk factors. *Diabetologia*. mars 1987;30(3):144-148.
176. Mattock MB, Cronin N, Cavallo-Perin P, Idzior-Walus B, Penno G, Bandinelli S, et al. Plasma lipids and urinary albumin excretion rate in Type 1 diabetes mellitus: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabet Med*. janv 2001;18(1):59-67.
177. Jones SL, Close CF, Mattock MB, Jarrett RJ, Keen H, Viberti GC. Plasma lipid and coagulation factor concentrations in insulin dependent diabetics with microalbuminuria. *BMJ*. 25 févr 1989;298(6672):487-490.
178. Dullaart RP, Dikkeschei LD, Doorenbos H. Alterations in serum lipids and apolipoproteins in male type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetologia*. sept 1989;32(9):685-689.
179. Jay RH, Jones SL, Hill CE, Richmond W, Viberti GC, Rampling MW, et al. Blood rheology and cardiovascular risk factors in type 1 diabetes: relationship with microalbuminuria. *Diabet Med*. sept 1991;8(7):662-667.
180. Thomas MC, Rosengård-Bärlund M, Mills V, Rönnback M, Thomas S, Forsblom C, et al. Serum lipids and the progression of nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. févr 2006;29(2):317-322.
181. Rivellese A, Riccardi G, Romano G, Giacco R, Patti L, Marotta G, et al. Presence of very low density lipoprotein compositional abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients; effects of blood glucose optimisation. *Diabetologia*. déc 1988;31(12):884-888.
182. Bagdade JD, Ritter MC, Subbaiah PV. Accelerated cholesteryl ester transfer in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*. avr 1991;21(2):161-167.

183. Dunn FL. Plasma lipid and lipoprotein disorders in IDDM. *Diabetes*. oct 1992;41 Suppl 2:102-106.
184. Kuksis A, Myher JJ, Geher K, Jones GJ, Breckenridge WC, Feather T, et al. Decreased plasma phosphatidylcholine/free cholesterol ratio as an indicator of risk for ischemic vascular disease. *Arteriosclerosis*. août 1982;2(4):296-302.
185. Klein RL, Lyons TJ, Lopes-Virella MF. Interaction of very-low-density lipoprotein isolated from type I (insulin-dependent) diabetic subjects with human monocyte-derived macrophages. *Metab Clin Exp*. nov 1989;38(11):1108-1114.
186. Lahdenperä S, Groop PH, Tilly-Kiesi M, Kuusi T, Elliott TG, Viberti GC, et al. LDL subclasses in IDDM patients: relation to diabetic nephropathy. *Diabetologia*. juill 1994;37(7):681-688.
187. James RW, Pometta D. Differences in lipoprotein subfraction composition and distribution between type I diabetic men and control subjects. *Diabetes*. oct 1990;39(10):1158-1164.
188. Skyrme-Jones RA, O'Brien RC, Luo M, Meredith IT. Endothelial vasodilator function is related to low-density lipoprotein particle size and low-density lipoprotein vitamin E content in type 1 diabetes. *J Am Coll Cardiol*. févr 2000;35(2):292-299.
189. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. août 1990;82(2):495-506.
190. Chapman MJ, Guérin M, Bruckert E. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J*. févr 1998;19 Suppl A:A24-30.
191. Vakkilainen J, Mäkimattila S, Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Lahdenperä S, Groop PH, et al. Endothelial dysfunction in men with small LDL particles. *Circulation*. 15 août 2000;102(7):716-721.
192. Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis*. avr 1992;93(3):189-199.
193. Caixàs A, Ordóñez-Llanos J, de Leiva A, Payés A, Homs R, Pérez A. Optimization of glycemic control by insulin therapy decreases the proportion of small dense LDL particles in diabetic patients. *Diabetes*. juill 1997;46(7):1207-1213.
194. Witztum JL, Mahoney EM, Branks MJ, Fisher M, Elam R, Steinberg D. Nonenzymatic glucosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes*. avr 1982;31(4 Pt 1):283-291.
195. Steinbrecher UP, Witztum JL. Glucosylation of low-density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes*. févr 1984;33(2):130-134.

196. De Castro SH, Castro-Faria-Neto HC, Gomes MB. Association of postprandial hyperglycemia with in vitro LDL oxidation in non-smoking patients with type 1 diabetes--a cross-sectional study. *Rev Diabet Stud.* 2005;2(3):157-164.
197. Bagdade JD, Subbaiah PV. Whole-plasma and high-density lipoprotein subfraction surface lipid composition in IDDM men. *Diabetes.* oct 1989;38(10):1226-1230.
198. Bagdade JD, Helve E, Taskinen MR. Effects of continuous insulin infusion therapy on lipoprotein surface and core lipid composition in insulin-dependent diabetes mellitus. *Metab Clin Exp.* mai 1991;40(5):445-449.
199. Fievet C, Theret N, Shojaee N, Duchateau P, Castro G, Ailhaud G, et al. Apolipoprotein A-I-containing particles and reverse cholesterol transport in IDDM. *Diabetes.* oct 1992;41 Suppl 2:81-85.
200. Link JJ, Rohatgi A, de Lemos JA. HDL cholesterol: physiology, pathophysiology, and management. *Curr Probl Cardiol.* mai 2007;32(5):268-314.
201. Boemi M, Leviev I, Sirolla C, Pieri C, Marra M, James RW. Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. *Atherosclerosis.* mars 2001;155(1):229-235.
202. Ferretti G, Bacchetti T, Busni D, Rabini RA, Curatola G. Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 2004;89(6):2957-2962.
203. Perségol L, Foissac M, Lagrost L, Athias A, Gambert P, Vergès B, et al. HDL particles from type 1 diabetic patients are unable to reverse the inhibitory effect of oxidised LDL on endothelium-dependent vasorelaxation. *Diabetologia.* nov 2007;50(11):2384-2387.
204. Bagdade JD, Dunn FL, Eckel RH, Ritter MC. Intraperitoneal insulin therapy corrects abnormalities in cholesteryl ester transfer and lipoprotein lipase activities in insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb.* déc 1994;14(12):1933-1939.
205. Colhoun HM, Scheek LM, Rubens MB, Van Gent T, Underwood SR, Fuller JH, et al. Lipid transfer protein activities in type 1 diabetic patients without renal failure and nondiabetic control subjects and their association with coronary artery calcification. *Diabetes.* mars 2001;50(3):652-659.
206. Dullaart RP, Groener JE, Dikkeschei BD, Erkelens DW, Doorenbos H. Elevated cholesteryl ester transfer protein activity in IDDM men who smoke. Possible factor for unfavorable lipoprotein profile. *Diabetes Care.* avr 1991;14(4):338-341.
207. Dullaart RP, Groener JE, Dikkeschei LD, Erkelens DW, Doorenbos H. Increased cholesteryl ester transfer activity in complicated type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus--its relationship with serum lipids. *Diabetologia.* janv 1989;32(1):14-19.

208. Ritter MC, Bagdade JD. Contribution of glycaemic control, endogenous lipoproteins and cholesteryl ester transfer protein to accelerated cholesteryl ester transfer in IDDM. *Eur J Clin Invest.* sept 1994;24(9):607-614.
209. Chang CK, Tso TK, Snook JT, Huang YS, Lozano RA, Zipf WB. Cholesteryl ester transfer and cholesterol esterification in type 1 diabetes: relationships with plasma glucose. *Acta Diabetol.* 2001;38(1):37-42.
210. Sammett D, Tall AR. Mechanisms of enhancement of cholesteryl ester transfer protein activity by lipolysis. *J Biol Chem.* 10 juin 1985;260(11):6687-6697.
211. Pruneta V, Pulcini T, Lalanne F, Marçais C, Berthezène F, Ponsin G, et al. VLDL-bound lipoprotein lipase facilitates the cholesteryl ester transfer protein-mediated transfer of cholesteryl esters from HDL to VLDL. *J Lipid Res.* déc 1999;40(12):2333-2339.
212. Bagdade JD, Ritter MC, Kitabchi AE, Huss E, Thistlethwaite R, Gabfr O, et al. Differing effects of pancreas-kidney transplantation with systemic versus portal venous drainage on cholesteryl ester transfer in IDDM subjects. *Diabetes Care.* oct 1996;19(10):1108-1112.
213. Vergès B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* nov 2005;31(5):429-439.
214. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 23 juill 1998;339(4):229-234.
215. Pyörälä K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev.* avr 1987;3(2):463-524.
216. De Vegt F, Dekker JM, Ruhé HG, Stehouwer CD, Nijpels G, Bouter LM, et al. Hyperglycaemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the Hoorn Study. *Diabetologia.* août 1999;42(8):926-931.
217. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation.* janv 1979;59(1):8-13.
218. Turner RC, Millns H, Neil HA, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, et al. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ.* 14 mars 1998;316(7134):823-828.
219. Patti L, Swinburn B, Riccardi G, Rivellese AA, Howard BV. Alterations in very low density lipoprotein subfractions in normotriglyceridemic non-insulin-dependent diabetics. *Atherosclerosis.* nov 1991;91(1-2):15-23.
220. Steiner G, Tkác I, Uffelman KD, Lewis GF. Important contribution of lipoprotein particle number to plasma triglyceride concentration in type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* mars 1998;137(1):211-214.

221. Taskinen M-R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*. juin 2003;46(6):733-749.
222. Kissebah AH, Alfarsi S, Evans DJ, Adams PW. Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein-B kinetics in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. mars 1982;31(3):217-225.
223. Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, et al. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia*. avr 1997;40(4):454-462.
224. Theriault A, Cheung R, Adeli K. Expression of apolipoprotein B in vitro in cell-free lysates of HepG2 cells: evidence that insulin modulates ApoB synthesis at the translational level. *Clin Biochem*. oct 1992;25(5):321-323.
225. Olofsson SO, Stillemark-Billton P, Asp L. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med*. nov 2000;10(8):338-345.
226. Wetterau JR, Lin MC, Jamil H. Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochim Biophys Acta*. 1 avr 1997;1345(2):136-150.
227. Lin MC, Gordon D, Wetterau JR. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression. *J Lipid Res*. mai 1995;36(5):1073-1081.
228. Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, et al. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem*. 24 mars 2000;275(12):8416-8425.
229. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell*. juill 2000;6(1):77-86.
230. Taskinen MR, Beltz WF, Harper I, Fields RM, Schonfeld G, Grundy SM, et al. Effects of NIDDM on very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B metabolism. Studies before and after sulfonylurea therapy. *Diabetes*. nov 1986;35(11):1268-1277.
231. Duvillard L, Pont F, Florentin E, Galland-Jos C, Gambert P, Vergès B. Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: a stable isotope kinetic study. *Eur J Clin Invest*. août 2000;30(8):685-694.
232. Taskinen MR, Nikkilä EA, Kuusi T, Harmo K. Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity. *Diabetologia*. janv 1982;22(1):46-50.
233. Tomkin GH, Owens D. Abnormalities in apo B-containing lipoproteins in diabetes and atherosclerosis. *Diabetes Metab Res Rev*. févr 2001;17(1):27-43.

234. Phillips C, Madigan C, Owens D, Collins P, Johson A, Tomkin JH. The role of diabetes in delayed chylomicron clearance. *Diabetologia*. 1999;42(suppl1):20SA.
235. Vakkilainen J, Mero N, Schweizer A, Foley JE, Taskinen M-R. Effects of nateglinide and glibenclamide on postprandial lipid and glucose metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. déc 2002;18(6):484-490.
236. Vergès BL. Dyslipidaemia in diabetes mellitus. Review of the main lipoprotein abnormalities and their consequences on the development of atherogenesis. *Diabetes Metab*. juin 1999;25 Suppl 3:32-40.
237. Duvillard L, Florentin E, Lizard G, Petit J-M, Galland F, Monier S, et al. Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy. *Diabetes Care*. mai 2003;26(5):1540-1544.
238. Wade DP, Knight BL, Soutar AK. Regulation of low-density-lipoprotein-receptor mRNA by insulin in human hepatoma Hep G2 cells. *Eur J Biochem*. 15 mai 1989;181(3):727-731.
239. Galland F, Duvillard L, Petit JM, Lagrost L, Vaillant G, Brun JM, et al. Effect of insulin treatment on plasma oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*. déc 2006;32(6):625-631.
240. Verges B, Brun JM, Vaillant G, Quantin C, Brunet-Lecomte P, Farnier M, et al. Influence of obesity and hypertriglyceridaemia on the low HDL2-cholesterol level and on its relationship with prevalence of atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. août 1992;18(4):289-297.
241. Duvillard L, Pont F, Florentin E, Gambert P, Vergès B. Inefficiency of insulin therapy to correct apolipoprotein A-I metabolic abnormalities in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. sept 2000;152(1):229-237.
242. Vergès B. Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. *Fundam Clin Pharmacol*. déc 2009;23(6):681-685.
243. Shulman RS, Herbert PN, Wehrly K, Fredrickson DS. The complete amino acid sequence of C-I (apoLp-Ser), an apolipoprotein from human very low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 10 janv 1975;250(1):182-190.
244. Jackson RL, Sparrow JT, Baker HN, Morrisett JD, Taunton OD, Gotto AM Jr. The primary structure of apolipoprotein-serine. *J Biol Chem*. 25 août 1974;249(16):5308-5313.
245. Rozek A, Sparrow JT, Weisgraber KH, Cushley RJ. Conformation of human apolipoprotein C-I in a lipid-mimetic environment determined by CD and NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 2 nov 1999;38(44):14475-14484.
246. Curry MD, McConathy WJ, Fesmire JD, Alaupovic P. Quantitative determination of apolipoproteins C-I and C-II in human plasma by separate electroimmunoassays. *Clin Chem*. avr 1981;27(4):543-548.

247. Cohn JS, Tremblay M, Batal R, Jacques H, Veilleux L, Rodriguez C, et al. Plasma kinetics of VLDL and HDL apoC-I in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects. *J Lipid Res.* oct 2002;43(10):1680-1687.
248. Carlson LA, Holmquist L. Concentrations of apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III and E in sera from normal men and their relation to serum lipoprotein levels. *Clin Chim Acta.* 15 sept 1982;124(2):163-178.
249. Riesen WF, Sturzenegger E. Enzyme-linked immunosorbent assay for apolipoprotein C-I. *J Clin Chem Clin Biochem.* oct 1986;24(10):723-727.
250. Wahlberg G, Holmquist L, Walldius G, Annuzzi G. Effects of nicotinic acid on concentrations of serum apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III and E in hyperlipidemic patients. *Acta Med Scand.* 1988;224(4):319-327.
251. Myklebost O, Rogne S. The gene for human apolipoprotein CI is located 4.3 kilobases away from the apolipoprotein E gene on chromosome 19. *Hum Genet.* août 1986;73(4):286-289.
252. Smit M, van der Kooij-Meijns E, Frants RR, Havekes L, Klasen EC. Apolipoprotein gene cluster on chromosome 19. Definite localization of the APOC2 gene and the polymorphic Hpa I site associated with type III hyperlipoproteinemia. *Hum Genet.* janv 1988;78(1):90-93.
253. Davison PJ, Norton P, Wallis SC, Gill L, Cook M, Williamson R, et al. There are two gene sequences for human apolipoprotein CI (apo CI) on chromosome 19, one of which is 4 kb from the gene for apo E. *Biochem Biophys Res Commun.* 14 mai 1986;136(3):876-884.
254. Lauer SJ, Walker D, Elshourbagy NA, Reardon CA, Levy-Wilson B, Taylor JM. Two copies of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. *J Biol Chem.* 25 mai 1988;263(15):7277-7286.
255. Li WH, Tanimura M, Luo CC, Datta S, Chan L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res.* mars 1988;29(3):245-271.
256. Shachter NS, Zhu Y, Walsh A, Breslow JL, Smith JD. Localization of a liver-specific enhancer in the apolipoprotein E/C-I/C-II gene locus. *J Lipid Res.* oct 1993;34(10):1699-1707.
257. Simonet WS, Bucay N, Lauer SJ, Taylor JM. A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice. *J Biol Chem.* 15 avr 1993;268(11):8221-8229.
258. Allan CM, Walker D, Taylor JM. Evolutionary duplication of a hepatic control region in the human apolipoprotein E gene locus. Identification of a second region that confers high level and liver-specific expression of the human apolipoprotein E gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* 3 nov 1995;270(44):26278-26281.

259. Allan CM, Taylor S, Taylor JM. Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coordinate the liver expression of the entire human apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster. *J Biol Chem.* 14 nov 1997;272(46):29113-29119.
260. Klasen EC, Talmud PJ, Havekes L, de Wit E, van der Kooij-Meijis E, Smit M, et al. A common restriction fragment length polymorphism of the human apolipoprotein E gene and its relationship to type III hyperlipidaemia. *Hum Genet.* mars 1987;75(3):244-247.
261. Smit M, van der Kooij-Meijis E, Woudt LP, Havekes LM, Frants RR. Exact localization of the familial dysbetalipoproteinemia associated HpaI restriction site in the promoter region of the APOC1 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 mai 1988;152(3):1282-1288.
262. Waterworth DM, Hubacek JA, Pitha J, Kovar J, Poledne R, Humphries SE, et al. Plasma levels of remnant particles are determined in part by variation in the APOC3 gene insulin response element and the APOC1-APOE cluster. *J Lipid Res.* juill 2000;41(7):1103-1109.
263. Xu Y, Berglund L, Ramakrishnan R, Mayeux R, Ngai C, Holleran S, et al. A common Hpa I RFLP of apolipoprotein C-I increases gene transcription and exhibits an ethnically distinct pattern of linkage disequilibrium with the alleles of apolipoprotein E. *J Lipid Res.* janv 1999;40(1):50-58.
264. Hubáček JA, Pitha J, Adámková V, Skodová Z, Lánská V, Poledne R. Apolipoprotein E and apolipoprotein C1 polymorphisms in the Czech population: almost complete linkage disequilibrium of the less frequent alleles of both polymorphisms. *Physiol Res.* 2003;52(2):195-200.
265. Shachter NS, Rabinowitz D, Stohl S, Conde-Knape K, Cohn JS, Deckelbaum RJ, et al. The common insertional polymorphism in the APOC1 promoter is associated with serum apolipoprotein C-I levels in Hispanic children. *Atherosclerosis.* avr 2005;179(2):387-393.
266. Seixas S, Trovoada MJ, Rocha J. Haplotype analysis of the apolipoprotein E and apolipoprotein C1 loci in Portugal and São Tomé e Príncipe (Gulf of Guinea): linkage disequilibrium evidence that APOE*4 is the ancestral APOE allele. *Hum Biol.* déc 1999;71(6):1001-1008.
267. Cohn JS, Tremblay M, Boulet L, Jacques H, Davignon J, Roy M, et al. Plasma concentration and lipoprotein distribution of ApoC-I is dependent on ApoE genotype rather than the Hpa I ApoC-I promoter polymorphism. *Atherosclerosis.* juill 2003;169(1):63-70.
268. Abildayeva K, Berbée JFP, Blokland A, Jansen PJ, Hoek FJ, Meijer O, et al. Human apolipoprotein C-I expression in mice impairs learning and memory functions. *J Lipid Res.* avr 2008;49(4):856-869.
269. Tycko B, Lee JH, Ciappa A, Saxena A, Li C-M, Feng L, et al. APOE and APOC1 promoter polymorphisms and the risk of Alzheimer disease in African American and Caribbean Hispanic individuals. *Arch Neurol.* sept 2004;61(9):1434-1439.

270. Shi J, Zhang S, Ma C, Liu X, Li T, Tang M, et al. Association between apolipoprotein CI HpaI polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in Chinese. *Acta Neurol Scand.* févr 2004;109(2):140-145.
271. Wroblewski MS, Wilson-Grady JT, Martinez MB, Kasthuri RS, McMillan KR, Flood-Urdangarin C, et al. A functional polymorphism of apolipoprotein C1 detected by mass spectrometry. *FEBS J.* oct 2006;273(20):4707-4715.
272. Kasthuri RS, McMillan KR, Flood-Urdangarin C, Harvey SB, Wilson-Grady JT, Nelsestuen GL. Correlation of a T45S variant of apolipoprotein C1 with elevated BMI in persons of American Indian and Mexican ancestries. *Int J Obes (Lond).* août 2007;31(8):1334-1336.
273. Lahiry P, Cao H, Ban MR, Pollex RL, Mamakeesick M, Zinman B, et al. APOC1 T45S polymorphism is associated with reduced obesity indices and lower plasma concentrations of leptin and apolipoprotein C-I in aboriginal Canadians. *J Lipid Res.* avr 2010;51(4):843-848.
274. Lin P-I, Vance JM, Pericak-Vance MA, Martin ER. No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *Am J Hum Genet.* mars 2007;80(3):531-538.
275. Windler E, Havel RJ. Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res.* mai 1985;26(5):556-565.
276. Quarfordt SH, Michalopoulos G, Schirmer B. The effect of human C apolipoproteins on the in vitro hepatic metabolism of triglyceride emulsions in the rat. *J Biol Chem.* 25 déc 1982;257(24):14642-14647.
277. Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 25 juin 1990;265(18):10771-10779.
278. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 25 déc 1990;265(36):22453-22459.
279. Swaney JB, Weisgraber KH. Effect of apolipoprotein C-I peptides on the apolipoprotein E content and receptor-binding properties of beta-migrating very low density lipoproteins. *J Lipid Res.* janv 1994;35(1):134-142.
280. Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem.* 25 sept 1991;266(27):18259-18267.

281. Clavey V, Lestavel-Delattre S, Copin C, Bard JM, Fruchart JC. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 1995;15(7):963-971.
282. Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, Lauer SJ, Taylor JM. Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J Biol Chem.* 15 mai 1991;266(14):8651-8654.
283. Shachter NS, Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Breslow JL, Ginsberg HN, et al. Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J Clin Invest.* 1 août 1996;98(3):846-855.
284. Jong MC, Gijbels MJ, Dahlmans VE, Gorp PJ, Koopman SJ, Ponc M, et al. Hyperlipidemia and cutaneous abnormalities in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J Clin Invest.* 1 janv 1998;101(1):145-152.
285. Jong MC, Dahlmans VE, van Gorp PJ, van Dijk KW, Breuer ML, Hofker MH, et al. In the absence of the low density lipoprotein receptor, human apolipoprotein C1 overexpression in transgenic mice inhibits the hepatic uptake of very low density lipoproteins via a receptor-associated protein-sensitive pathway. *J Clin Invest.* 15 nov 1996;98(10):2259-2267.
286. Westerterp M, de Haan W, Berbée JFP, Havekes LM, Rensen PCN. Endogenous apoC-I increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL. *J Lipid Res.* juin 2006;47(6):1203-1211.
287. Gåfvels ME, Caird M, Britt D, Jackson CL, Patterson D, Strauss JF 3rd. Cloning of a cDNA encoding a putative human very low density lipoprotein/apolipoprotein E receptor and assignment of the gene to chromosome 9pter-p23. *Somat Cell Mol Genet.* nov 1993;19(6):557-569.
288. Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, et al. Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem.* 21 janv 1994;269(3):2173-2182.
289. Wyne KL, Pathak K, Seabra MC, Hobbs HH. Expression of the VLDL receptor in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mars 1996;16(3):407-415.
290. Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, Tamai T, Miyabo S, et al. Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 30 juin 1995;270(26):15747-15754.
291. Jong MC, van Dijk KW, Dahlmans VE, Van der Boom H, Kobayashi K, Oka K, et al. Reversal of hyperlipidaemia in apolipoprotein C1 transgenic mice by adenovirus-mediated gene delivery of the low-density-lipoprotein receptor, but not by the very-low-density-lipoprotein receptor. *Biochem J.* 1 mars 1999;338 (Pt 2):281-287.

292. Berbée JFP, van der Hoogt CC, Sundararaman D, Havekes LM, Rensen PCN. Severe hypertriglyceridemia in human APOC1 transgenic mice is caused by apoC-I-induced inhibition of LPL. *J Lipid Res.* févr 2005;46(2):297-306.
293. Conde-Knape K, Bensadoun A, Sobel JH, Cohn JS, Shachter NS. Overexpression of apoC-I in apoE-null mice: severe hypertriglyceridemia due to inhibition of hepatic lipase. *J Lipid Res.* déc 2002;43(12):2136-2145.
294. Havel RJ, Fielding CJ, Olivecrona T, Shore VG, Fielding PE, Egelrud T. Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources. *Biochemistry.* 24 avr 1973;12(9):1828-1833.
295. Duivenvoorden I, Teusink B, Rensen PC, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. *Diabetes.* mars 2005;54(3):664-671.
296. Jong MC, Rensen PC, Dahlmans VE, van der Boom H, van Berkel TJ, Havekes LM. Apolipoprotein C-III deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wild-type and apoE knockout mice. *J Lipid Res.* oct 2001;42(10):1578-1585.
297. Goudriaan JR, Tacke PJ, Dahlmans VE, Gijbels MJ, van Dijk KW, Havekes LM, et al. Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* sept 2001;21(9):1488-1493.
298. Obunike JC, Lutz EP, Li Z, Paka L, Katopodis T, Strickland DK, et al. Transcytosis of lipoprotein lipase across cultured endothelial cells requires both heparan sulfate proteoglycans and the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 23 mars 2001;276(12):8934-8941.
299. Van der Hoogt CC, Berbée JFP, Espirito Santo SMS, Gerritsen G, Krom YD, van der Zee A, et al. Apolipoprotein CI causes hypertriglyceridemia independent of the very-low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein CIII in mice. *Biochim Biophys Acta.* févr 2006;1761(2):213-220.
300. Dautin G, Soltani Z, Ducloux D, Gautier T, Pais de Barros JP, Gambert P, et al. Hemodialysis reduces plasma apolipoprotein C-I concentration making VLDL a better substrate for lipoprotein lipase. *Kidney Int.* oct 2007;72(7):871-878.
301. Kinnunen PK, Ehnolm C. Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett.* 15 juin 1976;65(3):354-357.
302. Mezdour H, Jones R, Dengremont C, Castro G, Maeda N. Hepatic lipase deficiency increases plasma cholesterol but reduces susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Biol Chem.* 23 mai 1997;272(21):13570-13575.
303. Homanics GE, de Silva HV, Osada J, Zhang SH, Wong H, Borensztajn J, et al. Mild dyslipidemia in mice following targeted inactivation of the hepatic lipase gene. *J Biol Chem.* 17 févr 1995;270(7):2974-2980.

304. Applebaum-Bowden D, Kobayashi J, Kashyap VS, Brown DR, Berard A, Meyn S, et al. Hepatic lipase gene therapy in hepatic lipase-deficient mice. Adenovirus-mediated replacement of a lipolytic enzyme to the vascular endothelium. *J Clin Invest.* 1 févr 1996;97(3):799-805.
305. Francone OL, Gong EL, Ng DS, Fielding CJ, Rubin EM. Expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase in transgenic mice. Effect of human apolipoprotein AI and human apolipoprotein all on plasma lipoprotein cholesterol metabolism. *J Clin Invest.* sept 1995;96(3):1440-1448.
306. Van Ree JH, Hofker MH, van den Broek WJ, van Deursen JM, van der Boom H, Frants RR, et al. Increased response to cholesterol feeding in apolipoprotein C1-deficient mice. *Biochem J.* 1 févr 1995;305 (Pt 3):905-911.
307. Jong MC, van Ree JH, Dahlmans VE, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. Reduced very-low-density lipoprotein fractional catabolic rate in apolipoprotein C1-deficient mice. *Biochem J.* 15 janv 1997;321 (Pt 2):445-450.
308. Gautier T, Masson D, Jong MC, Duverneuil L, Le Guern N, Deckert V, et al. Apolipoprotein CI deficiency markedly augments plasma lipoprotein changes mediated by human cholesteryl ester transfer protein (CETP) in CETP transgenic/ApoCI-knocked out mice. *J Biol Chem.* 30 août 2002;277(35):31354-31363.
309. Gautier T, Tietge UJF, Boverhof R, Perton FG, Le Guern N, Masson D, et al. Hepatic lipid accumulation in apolipoprotein C-I-deficient mice is potentiated by cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* janv 2007;48(1):30-40.
310. Jonas A, Sweeny SA, Herbert PN. Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin: cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem.* 25 mai 1984;259(10):6369-6375.
311. Soutar AK, Garner CW, Baker HN, Sparrow JT, Jackson RL, Gotto AM, et al. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry.* 15 juill 1975;14(14):3057-3064.
312. De Haan W, Out R, Berbée JFP, van der Hoogt CC, van Dijk KW, van Berkel TJC, et al. Apolipoprotein CI inhibits scavenger receptor BI and increases plasma HDL levels in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 26 déc 2008;377(4):1294-1298.
313. Huard K, Bourgeois P, Rhainds D, Falstraalt L, Cohn JS, Brissette L. 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.* juin 2005;37(6):1308-1318.
314. Barter PJ, Jones ME. Kinetic studies of the transfer of esterified cholesterol between human plasma low and high density lipoproteins. *J Lipid Res.* févr 1980;21(2):238-249.

315. Gautier T, Masson D, de Barros JP, Athias A, Gambert P, Aunis D, et al. Human apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity. *J Biol Chem.* 1 déc 2000;275(48):37504-37509.
316. Gautier T, Masson D, Jong MC, Pais de Barros J-P, Duverneuil L, Le Guern N, et al. Apolipoprotein CI overexpression is not a relevant strategy to block cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity in CETP transgenic mice. *Biochem J.* 1 janv 2005;385(Pt 1):189-195.
317. Dumont L, Gautier T, de Barros J-PP, Laplanche H, Blache D, Ducoroy P, et al. Molecular mechanism of the blockade of plasma cholesteryl ester transfer protein by its physiological inhibitor apolipoprotein CI. *J Biol Chem.* 11 nov 2005;280(45):38108-38116.
318. Nishida HI, Arai H, Nishida T. Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins. *J Biol Chem.* 5 août 1993;268(22):16352-16360.
319. Masson D, Athias A, Lagrost L. Evidence for electronegativity of plasma high density lipoprotein-3 as one major determinant of human cholesteryl ester transfer protein activity. *J Lipid Res.* juill 1996;37(7):1579-1590.
320. Desrumaux C, Athias A, Masson D, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L. Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipid transfer protein. *J Lipid Res.* janv 1998;39(1):131-142.
321. De Barros J-PP, Boualam A, Gautier T, Dumont L, Vergès B, Masson D, et al. Apolipoprotein CI is a physiological regulator of cholesteryl ester transfer protein activity in human plasma but not in rabbit plasma. *J Lipid Res.* sept 2009;50(9):1842-1851.
322. Malmendier CL, Lontie JF, Grutman GA, Delcroix C. Metabolism of apolipoprotein C-I in normolipoproteinemic human subjects. *Atherosclerosis.* nov 1986;62(2):167-172.
323. Jong MC, Voshol PJ, Muurling M, Dahlmans VE, Romijn JA, Pijl H, et al. Protection from obesity and insulin resistance in mice overexpressing human apolipoprotein C1. *Diabetes.* déc 2001;50(12):2779-2785.
324. Koopmans SJ, Jong MC, Que I, Dahlmans VE, Pijl H, Radder JK, et al. Hyperlipidaemia is associated with increased insulin-mediated glucose metabolism, reduced fatty acid metabolism and normal blood pressure in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *Diabetologia.* avr 2001;44(4):437-443.
325. Muurling M, van den Hoek AM, Mensink RP, Pijl H, Romijn JA, Havekes LM, et al. Overexpression of APOC1 in obob mice leads to hepatic steatosis and severe hepatic insulin resistance. *J Lipid Res.* janv 2004;45(1):9-16.

326. Westerterp M, Berbée JFP, Delsing DJM, Jong MC, Gijbels MJJ, Dahlmans VEH, et al. Apolipoprotein C-I binds free fatty acids and reduces their intracellular esterification. *J Lipid Res.* juin 2007;48(6):1353-1361.
327. Van der Ham RLM, Alizadeh Dehnavi R, Berbée JFP, Putter H, de Roos A, Romijn JA, et al. Plasma apolipoprotein CI and CIII levels are associated with increased plasma triglyceride levels and decreased fat mass in men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* janv 2009;32(1):184-186.
328. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 13 août 1993;261(5123):921-923.
329. Kamino K, Yoshiiwa A, Nishiwaki Y, Nagano K, Yamamoto H, Kobayashi T, et al. Genetic association study between senile dementia of Alzheimer's type and APOE/C1/C2 gene cluster. *Gerontology.* 1996;42 Suppl 1:12-19.
330. Mullan M, Scibelli P, Duara R, Fallin D, Gold M, Schinka J, et al. Familial and population-based studies of apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 16 déc 1996;802:16-26.
331. Poduslo SE, Neal M, Schwankhaus J. A closely linked gene to apolipoprotein E may serve as an additional risk factor for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1 déc 1995;201(1):81-83.
332. Poduslo SE, Neal M, Herring K, Shelly J. The apolipoprotein CI A allele as a risk factor for Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* mars 1998;23(3):361-367.
333. Drigalenko E, Poduslo S, Elston R. Interaction of the apolipoprotein E and CI loci in predisposing to late-onset Alzheimer's disease. *Neurology.* juill 1998;51(1):131-135.
334. Scacchi R, Gambina G, Ruggeri M, Martini MC, Ferrari G, Silvestri M, et al. Plasma levels of apolipoprotein E and genetic markers in elderly patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 4 janv 1999;259(1):33-36.
335. Bartrés-Faz D, Junqué C, Clemente IC, Serra-Grabulosa JM, Guardia J, López-Alomar A, et al. MRI and genetic correlates of cognitive function in elders with memory impairment. *Neurobiol Aging.* juin 2001;22(3):449-459.
336. Serra-Grabulosa JM, Salgado-Pineda P, Junqué C, Solé-Padullés C, Moral P, López-Alomar A, et al. Apolipoproteins E and C1 and brain morphology in memory impaired elders. *Neurogenetics.* avr 2003;4(3):141-146.
337. Petit-Turcotte C, Stohl SM, Beffert U, Cohn JS, Aumont N, Tremblay M, et al. Apolipoprotein C-I expression in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* déc 2001;8(6):953-963.

338. Ji ZS, Pitas RE, Mahley RW. Differential cellular accumulation/retention of apolipoprotein E mediated by cell surface heparan sulfate proteoglycans. Apolipoproteins E3 and E2 greater than e4. *J Biol Chem.* 29 mai 1998;273(22):13452-13460.
339. Masson D, Pais de Barros J-P, Zak Z, Gautier T, Le Guern N, Assem M, et al. Human apoA-I expression in CETP transgenic rats leads to lower levels of apoC-I in HDL and to magnification of CETP-mediated lipoprotein changes. *J Lipid Res.* févr 2006;47(2):356-365.
340. Oitzl MS, Mulder M, Lucassen PJ, Havekes LM, Grootendorst J, de Kloet ER. Severe learning deficits in apolipoprotein E-knockout mice in a water maze task. *Brain Res.* 28 mars 1997;752(1-2):189-196.
341. Deary IJ, Whiteman MC, Pattie A, Starr JM, Hayward C, Wright AF, et al. Cognitive change and the APOE epsilon 4 allele. *Nature.* 29 août 2002;418(6901):932.
342. Deary IJ, Whiteman MC, Pattie A, Starr JM, Hayward C, Wright AF, et al. Apolipoprotein e gene variability and cognitive functions at age 79: a follow-up of the Scottish mental survey of 1932. *Psychol Aging.* juin 2004;19(2):367-371.
343. Deary IJ, Wright AF, Harris SE, Whalley LJ, Starr JM. Searching for genetic influences on normal cognitive ageing. *Trends Cogn Sci (Regul Ed).* avr 2004;8(4):178-184.
344. Berbée JFP, Vanmierlo T, Abildayeva K, Blokland A, Jansen PJ, Lütjohann D, et al. Apolipoprotein CI knock-out mice display impaired memory functions. *J Alzheimers Dis.* 2011;23(4):737-747.
345. Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, et al. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 19 mars 1999;274(12):7611-7614.
346. Hagberg L, Hull R, Hull S, McGhee JR, Michalek SM, Svanborg Edén C. Difference in susceptibility to gram-negative urinary tract infection between C3H/HeJ and C3H/HeN mice. *Infect Immun.* déc 1984;46(3):839-844.
347. Branger J, Knapp S, Weijer S, Leemans JC, Pater JM, Speelman P, et al. Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. *Infect Immun.* févr 2004;72(2):788-794.
348. Schurr JR, Young E, Byrne P, Steele C, Shellito JE, Kolls JK. Central role of toll-like receptor 4 signaling and host defense in experimental pneumonia caused by Gram-negative bacteria. *Infect Immun.* janv 2005;73(1):532-545.
349. Wang M, Jeng KC, Ping LI. Exogenous cytokine modulation or neutralization of interleukin-10 enhance survival in lipopolysaccharide-hyporesponsive C3H/HeJ mice with *Klebsiella* infection. *Immunology.* sept 1999;98(1):90-97.

350. Woods JP, Frelinger JA, Warrack G, Cannon JG. Mouse genetic locus *Lps* influences susceptibility to *Neisseria meningitidis* infection. *Infect Immun.* août 1988;56(8):1950-1955.
351. Bernheiden M, Heinrich JM, Minigo G, Schütt C, Stelter F, Freeman M, et al. LBP, CD14, TLR4 and the murine innate immune response to a peritoneal *Salmonella* infection. *J Endotoxin Res.* 2001;7(6):447-450.
352. Echtenacher B, Falk W, Männel DN, Krammer PH. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J Immunol.* 1 déc 1990;145(11):3762-3766.
353. Bagby GJ, Plessala KJ, Wilson LA, Thompson JJ, Nelson S. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor- α in intravascular and peritonitis models of sepsis. *J Infect Dis.* janv 1991;163(1):83-88.
354. Moore TA, Lau HY, Cogen AL, Monteleon CL, Standiford TJ. Anti-tumor necrosis factor- α therapy during murine *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: increased mortality in the absence of liver injury. *Shock.* oct 2003;20(4):309-315.
355. Harris HW, Gosnell JE, Kumwenda ZL. The lipemia of sepsis: triglyceride-rich lipoproteins as agents of innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2000;6(6):421-430.
356. Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J Clin Invest.* sept 1990;86(3):696-702.
357. Flegel WA, Baumstark MW, Weinstock C, Berg A, Northoff H. Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low- and high-density lipoproteins and by apolipoprotein A-I. *Infect Immun.* déc 1993;61(12):5140-5146.
358. Wu A, Hinds CJ, Thiemermann C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock.* mars 2004;21(3):210-221.
359. Weverling-Rijnsburger AWE, Jonkers IJAM, van Exel E, Gussekloo J, Westendorp RGJ. High-density vs low-density lipoprotein cholesterol as the risk factor for coronary artery disease and stroke in old age. *Arch Intern Med.* 14 juill 2003;163(13):1549-1554.
360. Delgado-Rodríguez M, Medina-Cuadros M, Martínez-Gallego G, Sillero-Arenas M. Total cholesterol, HDL-cholesterol, and risk of nosocomial infection: a prospective study in surgical patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* janv 1997;18(1):9-18.
361. Van Oosten M, Rensen PC, Van Amersfoort ES, Van Eck M, Van Dam AM, Breve JJ, et al. Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J Biol Chem.* 23 mars 2001;276(12):8820-8824.

362. Barlage S, Fröhlich D, Böttcher A, Jauhiainen M, Müller HP, Noetzel F, et al. ApoE-containing high density lipoproteins and phospholipid transfer protein activity increase in patients with a systemic inflammatory response. *J Lipid Res.* févr 2001;42(2):281-290.
363. Berbée JFP, van der Hoogt CC, Kleemann R, Schippers EF, Kitchens RL, van Dissel JT, et al. Apolipoprotein CI stimulates the response to lipopolysaccharide and reduces mortality in gram-negative sepsis. *FASEB J.* oct 2006;20(12):2162-2164.
364. Berbée JFP, Coomans CP, Westerterp M, Romijn JA, Havekes LM, Rensen PCN. Apolipoprotein CI enhances the biological response to LPS via the CD14/TLR4 pathway by LPS-binding elements in both its N- and C-terminal helix. *J Lipid Res.* juill 2010;51(7):1943-1952.
365. Berbée JFP, van der Hoogt CC, de Haas CJC, van Kessel KPM, Dallinga-Thie GM, Romijn JA, et al. Plasma apolipoprotein CI correlates with increased survival in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* mai 2008;34(5):907-911.
366. Berbée JFP, Mooijaart SP, de Craen AJM, Havekes LM, van Heemst D, Rensen PCN, et al. Plasma apolipoprotein CI protects against mortality from infection in old age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* févr 2008;63(2):122-126.
367. Schippers EF, Berbée JFP, van Disseldorp IM, Versteegh MIM, Havekes LM, Rensen PCN, et al. Preoperative apolipoprotein CI levels correlate positively with the proinflammatory response in patients experiencing endotoxemia following elective cardiac surgery. *Intensive Care Med.* août 2008;34(8):1492-1497.
368. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan Z. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 12 mars 2002;105(10):1158-1161.
369. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation.* 18 déc 2001;104(25):3103-3108.
370. Campbell LA, Kuo C. Chlamydia pneumoniae--an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol.* janv 2004;2(1):23-32.
371. Mussa FF, Chai H, Wang X, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. Chlamydia pneumoniae and vascular disease: an update. *J Vasc Surg.* juin 2006;43(6):1301-1307.
372. Nabipour I, Vahdat K, Jafari SM, Pazoki R, Sanjdideh Z. The association of metabolic syndrome and Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 1: the Persian Gulf Healthy Heart Study. *Cardiovasc Diabetol.* 2006;5:25.
373. Hauer AD, de Vos P, Peterse N, ten Cate H, van Berkel TJC, Stassen FRM, et al. Delivery of Chlamydia pneumoniae to the vessel wall aggravates atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. *Cardiovasc Res.* janv 2006;69(1):280-288.

374. Ezzahiri R, Nelissen-Vrancken HJMG, Kurvers HAJM, Stassen FRM, Vliegen I, Grauls GELM, et al. *Chlamydia pneumoniae* (Chlamydia pneumoniae) accelerates the formation of complex atherosclerotic lesions in Apo E3-Leiden mice. *Cardiovasc Res.* nov 2002;56(2):269-276.
375. Liu L, Hu H, Ji H, Murdin AD, Pierce GN, Zhong G. *Chlamydia pneumoniae* infection significantly exacerbates aortic atherosclerosis in an LDLR^{-/-} mouse model within six months. *Mol Cell Biochem.* déc 2000;215(1-2):123-128.
376. Moazed TC, Campbell LA, Rosenfeld ME, Grayston JT, Kuo CC. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Infect Dis.* juill 1999;180(1):238-241.
377. Westerterp M, Berbée JFP, Pires NMM, van Mierlo GJD, Kleemann R, Romijn JA, et al. Apolipoprotein C-I is crucially involved in lipopolysaccharide-induced atherosclerosis development in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 6 nov 2007;116(19):2173-2181.
378. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 19 déc 2002;420(6917):868-874.
379. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 14 sept 2000;407(6801):233-241.
380. Goldbourt U, Neufeld HN. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis.* août 1986;6(4):357-377.
381. Eo H-S, Kim D-I. Apolipoprotein C1 and apolipoprotein E are differentially expressed in atheroma of the carotid and femoral artery. *J Surg Res.* janv 2008;144(1):132-137.
382. Karpe F. Postprandial lipid metabolism in relation to coronary heart disease. *Proc Nutr Soc.* juill 1997;56(2):671-678.
383. Björkegren J, Packard CJ, Hamsten A, Bedford D, Caslake M, Foster L, et al. Accumulation of large very low density lipoprotein in plasma during intravenous infusion of a chylomicron-like triglyceride emulsion reflects competition for a common lipolytic pathway. *J Lipid Res.* janv 1996;37(1):76-86.
384. Björkegren J, Boquist S, Samnegård A, Lundman P, Tornvall P, Ericsson CG, et al. Accumulation of apolipoprotein C-I-rich and cholesterol-rich VLDL remnants during exaggerated postprandial triglyceridemia in normolipidemic patients with coronary artery disease. *Circulation.* 25 janv 2000;101(3):227-230.
385. Björkegren J, Silveira A, Boquist S, Tang R, Karpe F, Bond MG, et al. Postprandial enrichment of remnant lipoproteins with apoC-I in healthy normolipidemic men with early asymptomatic atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 sept 2002;22(9):1470-1474.
386. Hamsten A, Silveira A, Boquist S, Tang R, Bond MG, de Faire U, et al. The apolipoprotein CI content of triglyceride-rich lipoproteins independently predicts early atherosclerosis in healthy middle-aged men. *J Am Coll Cardiol.* 5 avr 2005;45(7):1013-1017.

387. Mak PA, Laffitte BA, Desrumaux C, Joseph SB, Curtiss LK, Mangelsdorf DJ, et al. Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 30 août 2002;277(35):31900-31908.
388. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 21 avr 2005;352(16):1685-1695.
389. Westerterp M, Van Eck M, de Haan W, Offerman EH, Van Berkel TJC, Havekes LM, et al. Apolipoprotein CI aggravates atherosclerosis development in ApoE-knockout mice despite mediating cholesterol efflux from macrophages. *Atherosclerosis.* nov 2007;195(1):e9-16.
390. Moore D, McNeal C, Macfarlane R. Isoforms of apolipoprotein C-I associated with individuals with coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 28 janv 2011;404(4):1034-1038.
391. Chang C-T, Liao H-Y, Chang C-M, Chen C-Y, Chen C-H, Yang C-Y, et al. Oxidized ApoC1 on MALDI-TOF and glycated-ApoA1 band on gradient gel as potential diagnostic tools for atherosclerotic vascular disease. *Clin Chim Acta.* mai 2013;420:69-75.
392. Van der Ham RLM, Dehnavi RA, van den Berg GA, Putter H, de Roos A, Berbée JFP, et al. Apolipoprotein CI levels are associated with atherosclerosis in men with the metabolic syndrome and systemic inflammation. *Atherosclerosis.* avr 2009;203(2):355-357.
393. Schmitt A, Schmitt J, Münch G, Gasic-Milencovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Anal Biochem.* 15 mars 2005;338(2):201-215.
394. Dullaart RP, Groener JE, Dikkeschei BD, Erkelens DW, Doorenbos H. Elevated cholesteryl ester transfer protein activity in IDDM men who smoke. Possible factor for unfavorable lipoprotein profile. *Diabetes Care.* avr 1991;14(4):338-341.
395. Bagdade JD, Lane JT, Subbaiah PV, Otto ME, Ritter MC. Accelerated cholesteryl ester transfer in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* déc 1993;104(1-2):69-77.
396. Riemens S, van Tol A, Sluiter W, Dullaart R. Elevated plasma cholesteryl ester transfer in NIDDM: relationships with apolipoprotein B-containing lipoproteins and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis.* sept 1998;140(1):71-79.

ANNEXE 1

Communication orale au congrès international de la Société Européenne d'Athérosclérose en Juin 2013

EAS 2013 - Oral Scheduling Notification A-547-0010-00435
81st European Atherosclerosis Society Congress
Lyon, France June 2-5, 2013

Dear Benjamin BOUILLET,

On behalf of the Scientific Program Committee, we are pleased to inform you that your abstract **A-547-0010-00435** entitled "**Glycation of apolipoprotein C1 leads to a loss of its ability to inhibit Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity during diabetes**" has been selected for **ORAL PRESENTATION** at the 80th European Atherosclerosis Society Congress. Details of the session in which your abstract is scheduled are listed below:

Session Title: **2.4 METABOLIC REGULATION OF APOLIPROTEIN A-I-CONTAINING LIPOPROTEINS**

Session Date: **Wednesday, June 5, 2016**

Session Time: **10:50 – 12:40**

Session Hall: **Hall B**

This session will consist of two invited lectures and up to four accepted oral presentations of ten minutes each. Detailed guidelines for the preparation of your presentation, equipment available and the PowerPoint presentation up-load procedures are available via this link: <http://www2.kenes.com/EAS2013/SCI/Pages/InstructionsforPresenters>

ANNEXE 2

Poster commenté présenté au congrès national de la Société Française de Diabétologie en Mars 2013

PO20 L'apolipoprotéine C1 présente une perte de sa capacité inhibitrice de la Cholesteryl Ester Transfer Protein au cours du diabète, en lien avec la glycation de l'apolipoprotéine C1

B. Bouillet, T. Gautier, D. Blache, J.-P. Pais De Barros, L. Duveillard, J. M. Petit, L. Lagrost, B. Verges
CHU Dijon/ INSERM U866, Dijon.

Introduction : Les patients diabétiques de type 1 (DT1) et de type 2 (DT2) présentent une élévation de l'activité de la Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP), qui est associée à une augmentation des pathologies cardio-vasculaires. Le mécanisme précis de cette augmentation demeure inconnu. L'apolipoprotéine C1 (apoC1) est un inhibiteur physiologique puissant de la CETP. Nous avons souhaité savoir si cette action inhibitrice de l'apoC1 sur la CETP était maintenue chez les patients diabétiques.

Patients et méthodes: Le dosage plasmatique de l'apoC1 et de la CETP par méthode immuno-enzymatique (ELISA) et la mesure de l'activité CETP par méthode radioactive ont été réalisés chez 70 patients DT1, 113 patients DT2 et 83 contrôles normolipidiques, normoglycémiques. L'effet de la glycation *in vitro* de l'apoC1 humaine par du méthylglyoxal (MGO) sur ses propriétés électrostatiques et son action inhibitrice sur l'activité CETP a été étudié. La charge électrostatique de l'apoC1 des sujets contrôles et DT1 a été étudiée par isoélectrofocalisation.

Résultats : L'activité CETP était significativement plus élevée chez les sujets DT1 et DT2 ($0,32 \pm 0,142$ et $0,43 \pm 0,135$ vs $0,25 \pm 0,075$ nmol 3H-CE/mg/h, $p < 0,0001$). La population contrôle présentait une corrélation négative, significative et indépendante entre l'apoC1 et l'activité CETP ($p = 0,001$). Cette corrélation n'était pas retrouvée chez les patients DT1 et DT2. L'apoC1 traitée par MGO présentait une modification de sa charge et une perte de sa capacité d'inhibition de l'activité CETP d'autant plus importante que la quantité de MGO était importante. Les propriétés électrostatiques de l'apoC1 des DT1 étaient modifiées en comparaison aux contrôles.

Conclusion : Les sujets diabétiques présentent une perte de la capacité inhibitrice de l'apoC1 sur la CETP. La glycation de l'apoC1 entraîne une modification de ses propriétés électrostatiques responsable de cette perte de fonctionnalité. L'apoC1 pourrait donc jouer un rôle dans l'augmentation du risque cardio-vasculaire au cours du diabète.

ANNEXE 3

Article soumis à la revue Diabetes Care le 25/06/2013 en cours de révision

Diabetes Care



Glycation of apolipoprotein C1 impairs its CETP inhibitory property: pathophysiological relevance in patients with type 1 and type 2 diabetes

Journal:	<i>Diabetes Care</i>
Manuscript ID:	DC13-1467
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	25-Jun-2013
Complete List of Authors:	Bouillet, Benjamin; CHU Dijon , Service Endocrinologie, Diabetologie, Maladies Métaboliques; INSERM research center URM 866 , University of Bourgogne Gautier, Thomas; INSERM research center URM 866, University of Bourgogne Blache, Denis; INSERM research center URM 866 , University of Bourgogne Pais de Barros, Jean-Paul; INSERM research center URM 866 , University of Bourgogne Duvillard, Laurence; INSERM research center URM 866 , University of Bourgogne Petit, Jean-Michel; CHU Dijon , Service Endocrinologie, Diabetologie, Maladies Métaboliques; INSERM research center URM 866 , University of Bourgogne Lagrost, Laurent; INSERM research center URM 866 , University of Bourgogne Verges, Bruno; CHU Dijon , Service Endocrinologie, Diabetologie, Maladies Métaboliques; INSERM research center URM 866 , University of Bourgogne
Key Words:	Apolipoprotein C1, Cholesteryl Ester Transfer Protein, Type 1 Diabetes, Type 2 Diabetes

SCHOLARONE™
Manuscripts

Glycation of apolipoprotein C1 impairs its CETP inhibitory property: pathophysiological relevance in patients with type 1 and type 2 diabetes

Benjamin Bouillet^{1,2} MD, Thomas Gautier² PHD, Denis Blache² PHD, Jean-Paul Pais de Barros², Laurence Duvillard² MD PHD, Jean-Michel Petit^{1,2} MD PHD, Laurent Lagrost² PHD, Bruno Vergès^{1,2} MD PHD

¹ Service Endocrinologie, Diabétologie et Maladies Métaboliques, University Hospital of Dijon, France

² INSERM research centre UMR 866, University of Bourgogne, Dijon, France

Corresponding author:

Benjamin Bouillet

Service Endocrinologie, Diabétologie et Maladies Métaboliques, Hôpital du Bocage,
2 Boulevard du Maréchal de Lattre de Tassigny
BP 77908, 21079 Dijon, France

Email : benjamin.bouillet@chu-dijon.fr; Phone : 33 3 80 29 34 53 ; Fax : 33 3 80 23 35 19

Word count: Abstract: 255; Main text: 4177

Number of tables: 3

Number of figures: 4

Running title: Glycation of apolipoprotein C1 impairs its CETP inhibitory property: pathophysiological relevance in patients with type 1 and type 2 diabetes

Imprim' Service



IMPRIM' SERVICE
90, rue de Mirande
21000 DIJON
Tél & Fax: 03 80 65 30 74