

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPORTANCE DU RÉCEPTEUR *CLUSTER OF DIFFERENTIATION-36*
DANS LE MÉTABOLISME DES LDL NATIVES ET OXYDÉES
CHEZ LA SOURIS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

VILAYPHONE LUANGRATH

NOVEMBRE 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

AVANT PROPOS

Depuis le début des années 2000, l'équipe du laboratoire du Dr Brissette a entamé une étude d'envergure portant sur l'implication du récepteur *cluster of differentiation-36* (CD36) dans le métabolisme hépatique des lipoprotéines. Les données recueillies jusqu'à maintenant ont été réalisées par l'emploi d'une lignée cellulaire d'hépatomes humains (HepG2) dans laquelle le niveau d'expression de CD36 a été réduit ou augmenté. Une étude dans le métabolisme *in vivo* devait être entreprise afin de s'assurer de l'effet physiologique de ce récepteur dans le métabolisme hépatique des lipoprotéines. C'est donc à cette étape que j'ai apporté ma contribution puisque mon premier rôle fut de vérifier l'importance de CD36 dans le métabolisme *in vivo* des lipoprotéines. Des analyses de clairances plasmatiques effectuées chez des souris de type sauvage exprimant de façon normale le CD36, et chez des souris déficientes pour le CD36 devaient permettre de mettre en évidence le rôle de ce récepteur au niveau physiologique.

De plus, le récepteur *scavenger* de classe B type I (SR-BI) est aussi un récepteur très étudié par notre laboratoire. Les résultats actuels ont permis de déterminer que ce récepteur contribue de différentes façons dans les voies cataboliques des lipoprotéines, notamment dans la captation sélective des EC des LDL. Les études *in vivo* ont d'ailleurs permis la publication, en 2005, d'un article intitulé « Physiological importance of SR-BI in the *in vivo* metabolism of human HDL and LDL in male and female mice » paru dans la revue *Journal of Lipid Research*, dont les auteurs sont : Brodeur, M.R., **Luangrath, V.**, Bourret, G., Falstrault, L. et Brissette, L. Par la suite, notre groupe s'est intéressé au rôle physiologique de SR-BI dans le métabolisme des LDL oxydées car nos études *in vitro* précédentes montraient une implication de ce récepteur dans le métabolisme de ces lipoprotéines hautement associées au développement de l'athérosclérose. L'étude *in vivo* réalisée par Bourret, G., Brodeur,

M.R., **Luangrath, V.**, Lapointe, J., Falstrault, L. et Brissette, L. a également permis la publication de l'article : « *In vivo* cholesteryl ester selective uptake of mildly and standardly oxidized LDL occurs by both parenchymal and nonparenchymal mouse hepatic cells but SR-BI is only responsible for standardly oxidized LDL selective uptake by nonparenchymal cells » dans la revue *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* en 2006.

Puisque les présentes données de notre laboratoire montrent une implication des récepteurs SR-BI et CD36 dans le métabolisme des lipoprotéines, il devenait intéressant d'étudier le rôle physiologique simultané de ces deux récepteurs. Ainsi, j'ai donc entrepris la génération de souris doublement déficientes pour les gènes SR-BI et CD36. L'étude est cependant aux premiers balbutiements puisqu'il m'a seulement été permis de mettre au point la technique de génotypage de ces souris. La caractérisation de ces souris ainsi que des expérimentations plus approfondies pourront donc être réalisées.

Enfin, j'aimerais faire part ici, de ma profonde gratitude envers les personnes qui ont permis la réalisation de ce projet. Je pense en premier lieu à ma directrice de recherche, Louise Brissette, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir initiée au vaste domaine du métabolisme des lipides. De part sa grande disponibilité, ses précieux conseils et surtout par sa rigueur scientifique, elle a été, sans contredit, une ligne directrice dans mon développement scientifique.

Je tiens aussi à remercier sincèrement notre assistante de recherche, Louise Falstrault, qui m'a donné tout au long de ce projet, de judicieux conseils et les outils nécessaires pour l'accomplir. Son organisation ainsi que son implication constante dans nos projets, font d'elle un élément clé de notre laboratoire.

Je remercie également mon très cher ami et collègue Mathieu, qui m'a initié au travail *in vivo* et qui m'a constamment secondé dans ce projet. Il est la personne qui a suscité

mon goût pour la recherche et qui m'a fait apprécier le travail d'équipe. Sans sa présence assidue, les journées interminables au laboratoire auraient été plus ardues et moins agréables.

Merci aussi à David, qui par ces passages au laboratoire, a toujours suscité des discussions intéressantes. Aux autres membres de cette équipe, To-Quyen, Pascale et Léo, merci pour votre dynamisme et la vie que vous apporté au laboratoire.

Je veux également remercier les gens de mon entourage immédiat, qui par leur non-appartenance au monde scientifique, m'ont permis de décrocher et qui m'ont enduré durant mes moments d'irritabilités! À tous... Merci !!!

TABLE DES MATIÈRES

AVANT PROPOS.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
RÉSUMÉ	xiv
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION	1
1. LES LIPOPROTÉINES	1
2. MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES.....	3
2.1 Voie exogène.....	3
Chylomicrons.....	3
2.2 Voie endogène.....	4
VLDL et IDL	4
LDL	4
Les LDL oxydées (LDLox)	5
HDL	7
3. CATABOLISME HÉPATIQUE DES LIPOPROTÉINES.....	8
3.1 Le foie	8

3.2 Captation globale	9
Récepteur de HDL	9
Récepteur de LDL (rLDL).....	9
Les récepteurs scavengers	10
Récepteurs scavengers de classe A.....	11
Cluster of differentiation-36 (CD36).....	12
Implication de CD36 dans la captation globale des LDLox.....	13
3.3 Captation sélective	15
Récepteur scavenger de classe B type I.....	16
Implication de SR-BI dans la captation sélective des EC de lipoprotéines natives	16
Implication de CD36 dans la captation sélective des EC de lipoprotéines natives	18
Implication de SR-BI et de CD36 dans la captation sélective des EC de LDLox.....	19
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	21
CHAPITRE II	23
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	23
1. MATÉRIEL	23
2. ÉLEVAGE ET GÉNÉRATION DES SOURIS.....	23
2.1 Génération des souris déficientes pour le récepteur CD36	23
2.2 Génération des souris déficientes pour le SR-BI	25
3. RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE.....	26

3.1 Génotypage des souris CD36	26
3.2 Génotypage des souris SR-BI	28
4. ISOLEMENT DES LIPOPROTÉINES	30
5. MARQUAGE DES LIPOPROTÉINES.....	30
6. OXYDATION DES LDL	31
7. ANALYSE DU DEGRÉ D'OXYDATION DES LDL PAR GEL AGAROSE 0,5%/BARBITAL.....	32
8. INJECTION <i>IN VIVO</i> DES LIPOPROTÉINES	32
9. ANALYSES PLASMATIQUES EN RADIOACTIVITÉ.....	33
10. MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ CONTENUE DANS LE FOIE.....	33
11. ANALYSES GRAPHIQUES DE LA CLAIRANCE.....	34
12. MÉTHODES STATISTIQUES ET AUTRES	35
CHAPITRE III	36
RÉSULTATS	36
1. EFFET DE L'OXYDATION DES LDL SUR LEUR CLAIRANCE	36
2. IMPLICATION DE CD36 DANS LE MÉTABOLISME DES LDL NATIVES.....	38
2.1 Clairances plasmatiques des LDL natives.....	38
2.2 Taux catabolique fractionnel des ¹²⁵ I-LDL et ³ H-CET-LDL	41
2.3 Contribution hépatique de CD36 dans la clairance des LDL natives	42

3. IMPLICATION DE CD36 DANS LE MÉTABOLISME DES LDL OXYDÉES À DIFFÉRENTS DEGRÉS	44
3.1 Rôle de CD36 dans la clairance plasmatique des LDL légèrement oxydées	44
3.2 Taux catabolique fractionnel de ^{125}I -LOX et ^3H -CEt-LOX	46
3.3 Contribution hépatique de CD36 dans le métabolisme des LDL légèrement oxydées	48
3.4 Impact des méthodes de marquage radioactif et de l'oxydation des LOX sur leur clairance plasmatique	50
3.5 Taux catabolique fractionnel de ^{125}I -LOX ₂ et ^3H -CEt-LOX ₂	52
3.6 Contribution hépatique de CD36 dans le métabolisme des LOX ₁ et des LOX ₂	54
3.7 Rôle de CD36 dans la clairance plasmatique des LDL fortement oxydées	54
3.8 Taux catabolique fractionnel des FOX	58
3.9 Contribution hépatique de CD36 dans le métabolisme des LDL fortement oxydées.....	59
3.10 Impact des méthodes de marquage radioactif et d'oxydation des FOX sur leur clairance plasmatique	60
3.11 Taux catabolique fractionnel des FOX ₂	63
3.12 Contribution hépatique de CD36 dans le métabolisme des FOX ₁ et des FOX ₂	63
3.13 Propriétés chimiques des lipoprotéines étudiées.....	65

3.14 Implication de SR-BI dans la clairance des LDL légèrement oxydées.....	66
3.15 Taux catabolique fractionnel des LOX ₂ métabolisées chez les souris sauvages et déficientes en SR-BI.....	69
CHAPITRE IV.....	71
DISCUSSION.....	71
CONCLUSION.....	83
BIBLIOGRAPHIE.....	84

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1	Mutagenèse utilisée pour la génération des souris déficientes pour le gène CD36	24
2	Mutagenèse utilisée pour la génération des souris déficientes pour le gène SR-BI	25
3	Confirmation du génotype des souris CD36 par la méthode de réaction de polymérisation en chaîne	27
4	Confirmation du génotype des souris SR-BI par la méthode de réaction de polymérisation en chaîne	29
5	Autoradiographie de la migration relative de LDL marquées à l' ^{125}I , non oxydées et oxydées à différents degrés	37
6	Clairance plasmatique de ^{125}I -LDL, ^{125}I -LOX et ^{125}I -FOX injectées chez des souris mâles sauvages	38
7	Clairance plasmatique de ^{125}I -LDL et ^3H -CET-LDL injectées chez des souris femelles et mâles sauvages et déficientes en CD36	40
8	Contribution hépatique de CD36 dans la clairance des ^{125}I -LDL et des ^3H -CET-LDL chez des souris femelles et mâles sauvages et déficientes en CD36	43
9	Clairance plasmatique de ^{125}I -LOX et ^3H -CET-LOX oxydées après le marquage radioactif et injectées chez des souris mâles sauvages et déficientes en CD36 selon différents bolus	45
10	Contribution hépatique du récepteur CD36 dans le métabolisme des LDL légèrement oxydées	49
11	Clairance plasmatique de ^{125}I -LOX ₂ et ^3H -CET-LOX ₂ oxydées avant le marquage radioactif et injectées chez des souris mâles sauvages et déficientes en CD36 selon différents bolus	51

12	Contribution hépatique du récepteur CD36 dans le métabolisme des LOX ₁ et LOX ₂	55
13	Clairance plasmatique de ¹²⁵ I-FOX et ³ H-CEt-FOX oxydées après le marquage radioactif et injectées chez des souris mâles sauvages et déficientes en CD36 selon différents bolus	56
14	Contribution hépatique du récepteur CD36 dans le métabolisme des LDL fortement oxydées	60
15	Clairance plasmatique de ¹²⁵ I-FOX ₂ et ³ H-CEt-FOX ₂ oxydées avant le marquage radioactif et injectées chez des souris mâles sauvages et déficientes en CD36 selon différents bolus	62
16	Contribution hépatique du récepteur CD36 dans le métabolisme des FOX ₁ et des FOX ₂	65
17	Autoradiographie de la migration relative des LDL natives, LOX ₁ , FOX ₁ , LOX ₂ et FOX ₂ sur gel agarose/barbital	66
18	Clairance plasmatique de ¹²⁵ I-LOX ₂ et ³ H-CEt-LOX ₂ oxydées avant le marquage et injectées chez des souris mâles sauvages et déficientes en SR-BI selon différents bolus	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
I	Composition en lipides et en protéines des différentes classes de lipoprotéines	2
II	Poids moléculaire des différentes classes d'apoprotéines	2
III	Taux catabolique fractionnel (TCF) de ^{125}I -LDL et ^3H -Cet-LDL injectées à des souris femelles et mâles CD36 (+/+) et déficientes en CD36 (-/-)	41
IV	Taux catabolique fractionnel (TCF) de ^{125}I -LOX et ^3H -Cet-LOX injectées à des souris mâles CD36 (+/+) et déficientes en CD36 (-/-)	47
V	Taux catabolique fractionnel (TCF) de ^{125}I -LOX ₂ et ^3H -Cet-LOX ₂ injectées à des souris mâles CD36 (+/+) et déficientes en CD36 (-/-)	53
VI	Taux catabolique fractionnel (TCF) de ^{125}I -FOX et ^3H -Cet-FOX injectées à des souris mâles CD36 (+/+) et déficientes en CD36 (-/-)	58
VII	Taux catabolique fractionnel (TCF) de ^{125}I -FOX ₂ et ^3H -Cet-FOX ₂ injectées à des souris mâles CD36 (+/+) et déficientes en CD36 (-/-)	64
VIII	Taux catabolique fractionnel (TCF) de ^{125}I -LOX ₂ et ^3H -Cet-LOX ₂ injectées à des souris mâles SR-BI (+/+) et déficientes en SR-BI (-/-)	70

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACAT :	Acyl coenzyme A cholestérol :acyltransférase
Apo :	Apoprotéine
CD36 :	Récepteur <i>Cluster of Differentiation-36</i>
CL :	Cholestérol libre
CLA-1 :	Récepteur <i>CD36 and LIMPII analogous-1</i>
CPM :	Coups par minute
EC :	Ester de cholestérol
EDL :	Lipase dérivée des cellules endothéliales
FOX :	LDL fortement oxydée
HDL :	Lipoprotéine de haute densité
HepG2 :	Lignée cellulaire d'hépatomes humains
HMG CoA :	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
IDL :	Lipoprotéine de densité intermédiaire
LCAT :	Lécithine-cholestérol acyltransférase
LDL :	Lipoprotéine de faible densité
LDLac :	LDL acétylée
LDLox :	LDL oxydée
LOX :	LDL légèrement oxydée
LOX-1 :	<i>Lectin-like receptor for ox-LDL-1</i>
LPL :	Lipoprotéine lipase
LRP :	Protéine apparentée au récepteur de LDL
MARCO :	<i>Macrophage receptor with collagenous structure</i>
M-BSA :	Albumine de sérum bovin maléylée
NDGGE :	Gel d'électrophorèse non dénaturant à gradients
rLDL :	Récepteur de LDL
SR-A :	Récepteur <i>scavenger</i> de classe A
SR-AI/II :	Récepteurs <i>scavenger</i> de classe A type I et II
SR-BI :	Récepteur <i>scavenger</i> classe B type I
TBARS :	Substance réagissant à l'acide thiobarbiturique
TCA :	Acide trichloroacétique
TG :	Triacylglycérol
VLDL :	Lipoprotéine de très faible densité

RÉSUMÉ

Les lipoprotéines sont des molécules sanguines composées de lipides et de protéines dont la fonction est de véhiculer les lipides, dont le cholestérol, vers les cellules de l'organisme. Le maintien de l'équilibre plasmatique en cholestérol est réalisé par le taux de synthèse et de captation qui peut s'effectuer principalement par deux voies. D'abord, la captation globale, est un processus d'épuration totale puisqu'elle consiste en la prise et la dégradation complète des lipoprotéines. Dans le cas des lipoprotéines à apoprotéine B, cette voie fait surtout intervenir le récepteur de lipoprotéine de faible densité (rLDL). Cependant, l'homéostasie cellulaire lipidique peut également être régulée par la voie de la captation sélective qui implique seulement la captation d'une fraction des lipides sans amener la dégradation des molécules protéiques. Cette voie fait intervenir l'action de récepteurs *scavengers* de classe B dont le *scavenger* de classe B type I (SR-BI). Le SR-BI, reconnu comme étant un récepteur de lipoprotéines de haute densité (HDL) ayant la capacité de prendre sélectivement les esters de cholestérol (EC), a également été reconnu pour sa capacité à lier et à capter sélectivement les EC d'autres classes de lipoprotéines, dont les LDL natives. Un autre récepteur dans la famille des récepteurs *scavengers* de classe B, le *Cluster of differentiation-36* (CD36) manifeste également son implication dans le métabolisme des lipoprotéines. Cependant, son rôle a surtout été démontré au niveau des LDL oxydées (LDLox). Il aurait aussi une faible implication au niveau du métabolisme des HDL. Son rôle dans le métabolisme des LDL reste encore à être défini.

Il est maintenant bien reconnu que de hauts niveaux de LDL plasmatiques ont une corrélation positive avec l'incidence de développement de maladies cardiovasculaires telle que l'athérosclérose. Ainsi, l'objectif du présent projet visait à élucider l'implication de CD36 dans le métabolisme des lipoprotéines de faible densité natives et oxydées à différents degrés. Cette étude a été réalisée grâce à des souris transgéniques déficientes pour le gène CD36 (-/-) et de souris sauvages (+/+) servant de contrôles. Le métabolisme des différentes lipoprotéines a été évalué selon des analyses de clairances plasmatiques. Pour ce faire, des lipoprotéines marquées radioactivement au niveau de leur portion protéique ou lipidique ont été injectées et des échantillons sanguins ont été prélevés pour mesurer la quantité de lipoprotéines résiduelles non métabolisées restant en circulation. Des courbes de clairances plasmatiques ont ensuite été tracées et à partir de celles-ci, le taux catabolique fractionnel (TCF) a été calculé pour chacune des parties (protéique et lipidique) des différentes lipoprotéines afin de quantifier la proportion de lipoprotéines métabolisées par les souris. Au terme de ces analyses, le foie des souris a été récolté et analysé

pour son contenu en radioactivité dans le but d'évaluer la contribution de cet organe dans le métabolisme des lipoprotéines à l'étude.

Les résultats montrent que les LDL et les LDL légèrement oxydées (LOX) sont soumises à la captation sélective, puisque la partie lipidique est éliminée plus rapidement que la partie protéique. Ce processus de prise sélective n'est toutefois pas retrouvé pour les LDL fortement oxydées (FOX) étant donné une clairance moins rapide en lipides qu'en protéines. L'absence de CD36 a pour effet d'accélérer la clairance de la partie protéique des LDL, mais ralentit de manière importante la clairance des LOX et des FOX. De plus, le foie contribue de façon importante au métabolisme des différentes lipoprotéines, mais le CD36 hépatique ne participe pas à cette prise hépatique. En somme, les LDL sont, en partie, éliminées par la voie de la captation sélective, mais leur oxydation progressive entraîne leur clairance via la captation globale. L'importance de CD36 dans l'élimination des LDL oxydées au niveau extra-hépatique suggère une contribution de ce récepteur dans le développement de l'athérosclérose.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. LES LIPOPROTÉINES

Les lipides remplissent un rôle essentiel dans le fonctionnement des êtres vivants. Ils sont non seulement une importante source d'énergie et un constituant primordial des membranes cellulaires, mais ils sont aussi des précurseurs de la synthèse des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires et de la vitamine D. Les lipides sont des molécules à haut caractère hydrophobe; ils ne circulent donc pas librement dans le courant sanguin. C'est entre autre, par leurs liaisons non-covalentes à des protéines amphipathiques, les apoprotéines (apo), que les lipides sont transportés vers les cellules et hors de celles-ci dans le plasma sanguin. Ces complexes lipides-protéines sont nommés lipoprotéines. La portion relative de lipides et de protéines dans les lipoprotéines varie considérablement; mais toute lipoprotéine est constituée d'un cœur hydrophobe composé de lipides neutres dont les triacylglycérols (TG) et les esters de cholestérol (EC), enveloppé d'une surface hydrophile formée d'une monocouche de phospholipides dans laquelle s'imbriquent le cholestérol et les apoprotéines (Horton *et al.* 1994). C'est entre autres par le rapport protéines/lipides que l'on distingue les lipoprotéines. Puisque les lipides ont une densité plus faible que celle des protéines, plus le pourcentage de protéines dans une lipoprotéine est élevé, plus sa densité est élevée. En ordre de densité, il y a les chylomicrons ayant une densité de 0,93 g/ml, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) dont la densité relative est évaluée entre 0,95 g/ml et 1,006 g/ml, les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) ayant une densité comprise entre 1,006 g/ml et 1,019 g/ml, les lipoprotéines de faible densité (LDL) possédant une densité de 1,019 g/ml à 1,063 g/ml et les lipoprotéines de haute densité (HDL) ayant une densité de 1,063 g/ml à 1,21 g/ml (Bradley *et al.* 1996). Le tableau I présente la composition en lipides et en protéines des différentes classes de lipoprotéines. La portion de protéines peut inclure une variété d'apoprotéines pouvant être contenues en proportions variables. Les

apoprotéines déterminent le destin métabolique des lipoprotéines car leur principale fonction est de permettre la reconnaissance des lipoprotéines par des enzymes et des récepteurs. Le tableau II montre les différentes classes d'apoprotéines ainsi que leurs sous-classes et isoformes.

Tableau I : Composition en lipides et en protéines des différentes classes de lipoprotéines (Fielding et Fielding 1996).

Classes de lipoprotéine	Diamètre (Å)	Lipides (% p/p)				Protéines (% p/p)	Apoprotéines contenues
		TG	EC	CL	PL		
Chylomicrons	800 à 5 000	86	3	2	7	2	apoA-I,-IV apoB-48 apoC-I,-II,-III apoE
VLDL	300 à 800	55	12	7	18	8	apoB-100 apoC-I,-II,-III apoE
IDL	250 à 350	23	29	9	19	19	apoB-100 apoC-I,-II,-III apoE
LDL	220 à 272	6	42	8	22	22	apoB-100
HDL ₂	90 à 100	5	17	5	33	40	apoA-I,-II apoC-I,-II,-III apoE
HDL ₃	70 à 90	3	13	4	25	55	apoA-I,-II apoC-I,-II,-III

Tableau II : Poids moléculaire des différentes classes d'apoprotéines (Mackness et Durrington 1995).

Classes d'apoprotéines		A			B		C			E		
Sous-classes et isoformes		A-I	A-II	A-IV	B-48	B-100	C-I	C-II	C-III	E2	E3	E4
Poids moléculaire	kDa	28	17	44,5	264	550	6,6	8,9	8,8	34	34	34

2. MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES

2.1 Voie exogène

Chylomicrons

Avec le foie, le petit intestin joue un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines car c'est à partir de ce dernier que les TG et le cholestérol provenant de la diète sont absorbés et assemblés pour former de grosses lipoprotéines riches en TG, les chylomicrons. À leur état initial, la principale apoprotéine présente sur les chylomicrons est l'apoB-48, une forme tronquée de l'apoB-100. La fonction majeure des chylomicrons est de véhiculer le cholestérol et les TG de la diète vers les cellules utilisatrices via la lymphe et ensuite le sang. Au niveau du chyle, les chylomicrons acquièrent l'apoC-II et l'apoE nécessaires pour leur clairance. Une fois dans le système sanguin, les chylomicrons sont rapidement métabolisés par la lipoprotéine lipase (LPL) située à la surface des cellules endothéliales des tissus extra-hépatiques tels les muscles et les tissus adipeux. La LPL et son co-facteur, l'apoC-II, hydrolysent les TG pour former des molécules plus petites et moins riches en triglycérides, des résidus de chylomicrons (Santamaria-Fojo et Brewer 1991). Ces résidus sont principalement pris en charge par le récepteur de LDL (rLDL) par l'entremise de l'apoE (Windler *et al.* 1980a) (Windler *et al.* 1988) au niveau des cellules parenchymateuses du foie (Jones *et al.* 1984), et par la protéine apparentée au rLDL, la LRP (Hussain *et al.* 1991). Une fois à l'intérieur de l'hépatocyte, le résidu de chylomicron est digéré dans les lysosomes via endocytose (Shafi *et al.* 1994), où les esters de cholestérol sont scindés pour libérer le cholestérol libre (CL). Le CL peut être utilisé pour la synthèse des membranes, être stocké sous forme d'ester, être excrété dans la bile après conversion en acides biliaires, ou il peut être utilisé pour former les lipoprotéines endogènes sécrétées dans le plasma.

2.2 Voie endogène

VLDL et IDL

Le foie est la principale source de VLDL, qui transporte vers les tissus périphériques, mais surtout vers les tissus adipeux les TG fabriqués ou transformés dans le foie. Chez l'humain, les composantes protéiques majeures des VLDL sont l'apoB-100 et l'apoE. Comme dans le cas des chylomicrons, la LPL et l'apoC-II sont en majeure partie responsables de l'hydrolyse de ces TG en acides gras. Ces acides gras sont utilisés par les cellules comme source d'énergie. Les lipoprotéines qui en résultent sont nommées IDL ou résidus de VLDL. Ces derniers peuvent être purgés de la circulation sanguine par le rLDL et la LRP via le ligand apoE, ou être remaniés en LDL par la lipase hépatique (LH) et la LPL (Mahley 1988) (Jones *et al.* 1984). Contrairement à l'humain, le foie des rongeurs a la capacité de sécréter de l'apoB-48. Ainsi, on retrouve dans ces animaux des VLDL contenant de l'apoB-48 et d'autres de l'apoB-100 (Salter *et al.* 1998). Cette différence entre la composition des VLDL humaines et de rongeurs serait responsable de la capture rapide des IDL par le foie chez les rongeurs et la quasi-absence des LDL chez cette espèce animale (Brissette *et al.* 1986).

LDL

Les LDL sont des lipoprotéines riches en cholestérol dont le rôle consiste à transporter le cholestérol vers les tissus périphériques, ce qui permet aux cellules de synthétiser des membranes ou des hormones, ou de les mettre en réserve en vue d'une utilisation ultérieure. L'apoB-100, l'unique protéine présente sur les LDL, est le ligand qui permet au rLDL d'épurer les LDL de la circulation sanguine. Les LDL régulent de différentes manières le taux de cholestérol dans les cellules. Ainsi, ces lipoprotéines sont des acteurs importants dans l'athérogenèse. En effet, il existe une corrélation positive entre une concentration plasmatique élevée en LDL et les

maladies cardio-vasculaires. Toutefois, la concentration n'est pas le seul paramètre impliqué dans le caractère athérogène des LDL car l'aspect qualitatif de ces particules, c'est-à-dire la taille ainsi que la densité sont également reliées à un haut potentiel athérogène (Austin *et al.* 1990).

Les LDL oxydées (LDLox)

L'athérogenèse est induite par des taux élevés de lipoprotéines plasmatiques athérogènes comme les LDL et les VLDL. Ceci amène une accumulation de LDL dans la paroi artérielle où elles deviennent modifiées. Cette modification des LDL active les cellules endothéliales le long des vaisseaux sanguins, qui à leur tour attirent les monocytes de la circulation sanguine par le relâchement de la protéine-I chimiotactile des monocytes (Cushing *et al.* 1990). Ces derniers adhèrent aux cellules endothéliales, migrent à travers la paroi endothéliale jusqu'à l'espace sous-endothélial où ils se différencient en macrophages (Rajavashisth *et al.* 1990) pour éventuellement devenir des cellules spumeuses. Ces cellules spumeuses sont caractérisées par une accumulation accrue d'esters de cholestérol, résultante d'une captation par les récepteurs *scavengers* de lipoprotéines modifiées comme les LDL oxydées (LDLox).

Certains facteurs peuvent modifier les LDL et ainsi augmenter leur captation par les macrophages. Parmi ces modifications on compte l'acétylation, la glycation, l'agrégation, la formation de complexe avec les protéoglycanes et le plus important, l'oxydation. *In vivo*, des facteurs intrinsèques (composition des LDL) et extrinsèques (environnement) peuvent occasionner l'oxydation des LDL. La composition en acides gras est un facteur important puisqu'une grande proportion d'acides gras polyinsaturés confère aux LDL une plus grande susceptibilité à l'oxydation tandis que les acides gras monoinsaturés auraient un rôle protecteur contre l'oxydation (Reaven *et al.* 1993). La taille ainsi que la densité des LDL ont également une

influence sur l'oxydation des LDL. Plus précisément, les LDL petites et denses possèdent une moins bonne affinité pour le rLDL (Galeano *et al.* 1994), ce qui rend leur épuration moins rapide, prolongeant ainsi leur demi-vie dans la circulation sanguine. Cette persistance au niveau du courant sanguin les expose davantage à des modifications oxydatives (Chait *et al.* 1993) (De-Graaf *et al.* 1993). La concentration en antioxydants, la présence de métaux, le pH acide et la présence de certains systèmes enzymatiques font partis des facteurs environnementaux pouvant influencer l'oxydation des LDL (Young et McEneaney 2001). Par exemple, un environnement acide peut induire l'oxydation des LDL par la myéloperoxydase et peut affecter les interactions des LDL avec les composantes de la paroi artérielle.

L'oxydation amène des changements tant physiques que chimiques des LDL et modifie leur composition en cholestérol, en acide gras et en apoprotéine de la lipoprotéine (Steinbrecher 1987). L'oxydation entraîne une réaction en chaîne qui altère la composition chimique des chaînes d'acides gras et forme des aldéhydes hautement réactifs. Ces derniers peuvent lier le groupement amine de l'apoB-100 et conférer une charge négative à celle-ci qui devient moins reconnaissable par le rLDL et devient un ligand des récepteurs *scavengers* tels que les récepteurs de classe A (SR-A) et le récepteur *Cluster of differentiation-36* (CD36) (Zhang *et al.* 1993) (Kunjathoor *et al.* 2002). Diverses méthodes sont présentement utilisées *in vitro* pour oxyder les LDL. Certaines études exploitent les métaux comme le fer et le cuivre. Ces méthodes sont facilement reproductibles et permettent l'oxydation à différents degrés, mais seraient moins représentatives de la physiologie normale puisque ces métaux sont habituellement chélatés par des protéines. Des procédés plus physiologiques sont ceux utilisant les cellules endothéliales, les monocytes ou les macrophages pour générer des LDLox. Ces procédés ont toutefois le désavantage d'engendrer des préparations plus ou moins constante en terme de degré d'oxydation.

L'implication des LDLox dans l'athérosclérose fait l'objet de recherches depuis maintes années et plusieurs aspects restent à être élucidés. La présence *in vivo* des LDLox a été un sujet discutable, mais certaines évidences tendent maintenant à démontrer leur existence. D'abord, de l'apoB-100 oxydée et des produits de la peroxydation lipidique ont été détectés dans les lésions athéromateuses humaines et de lapin (Ylä-Herttuala *et al.* 1989). Des anticorps dirigés contre les LDLox ont aussi été démontrés dans les lésions athéromateuses (Palinski *et al.* 1989). De plus, des anticorps anti-LDLox ont été identifiés dans le plasma sanguin, et les titres semblent être en accord avec la progression des lésions athéromateuses (Palinski *et al.* 1989). Récemment, des études ont également détecté la présence de LDLox dans la circulation sanguine (Itabe et Takano 2000) (Toshima *et al.* 2000). Le métabolisme des LDLox est maintenant mieux connu et il y a de plus en plus d'évidences de l'implication des LDLox dans le développement de l'athérosclérose. La clairance des LDLox a également été étudiée et les résultats obtenus tendent à démontrer que la clairance des LDLox se fait principalement par le foie (Ling *et al.* 1997). Toutefois, le ou les récepteurs en cause n'ont pas encore été identifiés.

HDL

La fonction principale des HDL est de transporter le cholestérol des tissus périphériques vers le foie, où il est transformé en acides biliaires et ensuite éliminé dans le cycle entéro-hépatique. Les HDL peuvent être générées par des vésicules secondaires des chylomicrons et des VLDL, mais peuvent aussi être synthétisées *de novo* par le foie ou l'intestin comme dans le cas des apoprotéines principales, l'apoA-I, l'apoA-II et l'apoE (Eisenberg 1984). Dans ce cas-ci, la particule sécrétée pauvre en lipides et sous forme discoïdale acquière par la suite des lipides de différentes avenues. D'abord, le CL peut être issu de diverses sources dont la surface des résidus de chylomicrons ou de VLDL, d'autres lipoprotéines ou même de la membrane plasmique de cellules périphériques. Ce processus par lequel les HDL acquièrent le

CL de la membrane cellulaire est communément appelé efflux de cholestérol. Les molécules de CL situées en périphérie des HDL sont alors estérifiées par une enzyme plasmatique, la lécithine cholestérol acyl-transférase (LCAT), et ces EC migrent vers le noyau de la molécule de HDL, formant une particule arrondie de HDL. Dans certaines espèces tel l'humain, les HDL peuvent donner leurs EC aux VLDL/LDL et recevoir des TG de ces mêmes lipoprotéines grâce à une autre enzyme appelée protéine de transfert de cholestérol (CETP). La quantité de lipides engendre des lipoprotéines de différentes densités et donc, des sous-classes de HDL. Les HDL peuvent également retourner au foie et livrer leurs EC par la voie de la captation sélective. Ce processus dans lequel les HDL ramènent le cholestérol et les esters de cholestérol endogènes jusqu'au foie est nommé transport inverse du cholestérol (Fielding 1993). C'est ce processus qui donne aux HDL la mention d'être anti-athérogène.

3. CATABOLISME HÉPATIQUE DES LIPOPROTÉINES

3.1 Le foie

Le métabolisme des lipoprotéines est surtout accompli par le foie. Le foie est l'organe le plus volumineux et le plus complexe au niveau métabolique chez l'humain. Il est constitué de deux types cellulaires, les cellules parenchymateuses communément appelées hépatocytes, et les cellules non-parenchymateuses comprenant les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer. Les hépatocytes sont les principaux constituants cellulaires du foie et sont multifonctionnels. Les cellules endothéliales quant à elles, assurent les échanges entre les hépatocytes et les molécules plasmatiques du sang comme les lipoprotéines. Les cellules de Kupffer sont des macrophages hépatiques ayant comme principales fonctions la phagocytose de particules étrangères, l'élimination d'endotoxines et d'autres substances nocives. Ces

différents types cellulaires hépatiques possèdent bon nombre de récepteurs impliqués dans la liaison et la captation des lipoprotéines. Seuls les récepteurs présents au foie et pouvant lier les HDL, les LDL natives et oxydées par un mécanisme de captation globale ou sélective seront abordés ici.

3.2 Captation globale

Récepteur de HDL

La captation globale est la voie par laquelle une lipoprotéine est entièrement captée et complètement dégradée dans une cellule. À ce jour, on sait que les HDL sont dégradées par le foie et les reins, mais le ou les récepteurs impliqués ne sont pas encore clairement identifiés. L'étude effectuée par Hammad et ses collègues (1999) suggérait la cubuline comme étant un récepteur impliqué dans l'endocytose des HDL amenant à une dégradation lysosomale. D'un autre côté, l'équipe de Strauss *et al.* (2002) a démontré par l'emploi de la lignée cellulaire d'hépatomes humains (HepG2) que la lipase dérivée des cellules endothéliales (EDL) facilitait la liaison et la dégradation des HDL. Jusqu'à ce jour, l'identité du récepteur hépatique n'est donc pas clairement établie.

Récepteur de LDL (rLDL)

La situation est cependant plus claire pour la dégradation des LDL. En effet, le rLDL constitue le récepteur le plus étudié et le mieux caractérisé dans le métabolisme des lipides. Sa découverte ainsi que sa caractérisation furent réalisées par les professeurs Brown et Goldstein, lauréats du prix Nobel en 1985. Il est impliqué dans le catabolisme des LDL tant au niveau hépatique qu'au niveau des tissus périphériques. Le rLDL est une protéine monomérique de 160 kDa constituée d'une région extracellulaire, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique. La portion N-terminale de 292 résidus constitue le domaine de séquestration de la molécule

LDL, et six résidus retrouvés dans la queue cytoplasmique définissent le signal d'internalisation (Cooper 1999). Ce récepteur répertorié à la surface cellulaire de la plupart des cellules reconnaît deux ligands spécifiques : l'apoB-100 et l'apoE. Le dernier possède une meilleure affinité pour le rLDL que l'apoB (Pitas *et al.* 1980) (Windler *et al.* 1980b). Le processus par lequel le rLDL capte les LDL se fait de la façon suivante. D'abord, le rLDL situé dans les invaginations riches en clathrines de la membrane plasmique des différentes cellules se lie, par l'apoB, à une molécule de LDL. S'ensuit alors l'internalisation par endocytose de ce complexe récepteur-ligand dans une vésicule tapissée de clathrines obtenue après le bourgeonnement d'une invagination membranaire. La vésicule ainsi formée fusionne avec un endosome précoce et forme à son tour un endosome tardif. C'est à ce niveau que le contenu est trié : le rLDL est recyclé vers la membrane plasmique et la molécule de LDL est transférée à un lysosome pour sa dégradation. À l'intérieur du lysosome, l'apoB des LDL est dégradée en acides aminés tandis que les EC sont hydrolysés en CL et en acides gras. Le cholestérol libéré de la lipoprotéine joue un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol cellulaire puisqu'il régule à la baisse l'expression du rLDL en vue de limiter l'absorption des LDL (Russell *et al.* 1983), et diminue la synthèse endogène de cholestérol en réduisant l'expression et l'activité de l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) réductase (Luskey *et al.* 1983). De plus, le surplus de cholestérol nouvellement arrivé peut activer l'acyl-CoA : cholestérol acyltransférase (ACAT), enzyme qui estérifie le cholestérol afin de l'entreposer dans les cellules (Goldstein *et al.* 1974).

Les récepteurs scavengers

Les récepteurs *scavengers* sont des protéines multifonctionnelles qui interviennent tant au niveau du métabolisme des lipoprotéines, qu'au niveau des réponses immunitaires, de l'adhésion cellulaire, de la phagocytose des cellules étrangères et apoptotiques (Terpstra *et al.* 2000). Des études de liaison et de compétition ont pu

relier une multitude de ligands aux récepteurs *scavengers*. Ces ligands sont principalement des molécules polyanioniques dont certaines protéines modifiées telles que les LDLox, les LDL modifiées par acétylation (LDLac), l'albumine de sérum bovin maléylée (M-BSA) (Jialal et Chait 1989), et des phospholipides anioniques comme la phosphatidylsérine (Nishikawa *et al.* 1990). L'implication des récepteurs *scavengers* dans le métabolisme des lipoprotéines a surtout été démontrée pour les lipoprotéines modifiées (LDLox, LDLac), mais on reconnaît de plus en plus une implication des récepteurs *scavengers* de classe B au niveau du métabolisme des lipoprotéines natives (HDL, LDL).

Récepteurs scavengers de classe A

Les récepteurs *scavengers* de classe A (SR-A) regroupent différents récepteurs dont les principaux demeurent les récepteurs de type I et II (SR-AI/II) et MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*). Les SR-A sont majoritairement exprimés par les macrophages, mais on les retrouve également à la surface d'autres cellules comme les fibroblastes, les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales (Naito *et al.* 1991). La caractérisation moléculaire des SR-A a débuté en 1990 par l'équipe de Krieger avec le clonage du SR-A bovin (Kodama *et al.* 1990). Krieger et ses collègues ont démontré que les SR-A étaient des glycoprotéines transmembranaires trimériques composées de six domaines distincts dont l'un d'eux, le domaine collagèneux, est le site impliqué dans la liaison avec les lipoprotéines modifiées. Plus précisément, ce domaine collagèneux contient une région riche en résidus lysine, lui conférant une charge positive qui interagit spécifiquement avec les ligands chargés négativement (Doi *et al.* 1993). Ceci corrobore les études de liaison et de compétition qui démontrèrent que ces ligands sont généralement des molécules polyanioniques.

Plusieurs études ont révélé l'importance du SR-A dans l'athérogenèse. En effet, les SR-A ont d'abord été identifiés sur les macrophages comme des récepteurs

spécifiques de LDLac initiant la formation de plaques d'athéromes. Des études *in vitro* de surexpression des SR-A indiquèrent une augmentation de la formation de cellules spumeuses ainsi qu'une accumulation d'EC suite à la présence de LDLac (Freeman *et al.* 1991) (De Winther *et al.* 1999). Il a aussi été déterminé que les SR-A étaient fortement exprimés dans les lésions athéromateuses où l'on retrouve également l'un de leurs ligands, les LDLox (Matsumoto *et al.* 1990) (Ylä-Herttuala *et al.* 1989). De plus, des études *in vivo* effectuées avec un modèle murin déficient pour le gène des SR-A suggérèrent que les SR-A sont des molécules pro-athérogènes puisqu'une déficience pour les SR-A amenait une réduction marquée de la taille des lésions athéromateuses (Suzuki *et al.* 1997) (Sakaguchi *et al.* 1998). D'autre part, l'équipe de Steinbrecher (Lougheed *et al.* 1997) démontra que les macrophages issus du modèle murin déficient en SR-A dégradèrent 80% moins les LDLac, ce qui suggèrent la contribution de ces récepteurs dans la dégradation des LDLac. Au contraire, leurs données relatives à la dégradation des LDLox indiquèrent une contribution moindre de ces récepteurs. Effectivement, la dégradation des LDLox par les macrophages des souris déficientes pour les SR-A présentaient seulement une diminution de 30%, indiquant que la dégradation des LDLox est attribuable à un ou des récepteur(s) autre(s) que les SR-A. De plus, les études de clairance plasmatique de LDL modifiées corroborent les études de dégradation puisqu'elles n'ont pas rapporté de différence significative entre les souris déficientes en SR-A et les souris exprimant normalement les SR-A (Ling *et al.* 1997) (van Berkel *et al.* 1991). Ceci laisse donc entrevoir l'implication d'autres récepteurs dans la clairance des LDL modifiées et plus particulièrement pour les LDLox.

Cluster of differentiation-36 (CD36)

Le CD36, découvert en 1976, est l'un des membres de la famille des *scavengers* de classe B. Cette protéine membranaire constituée de 472 acides aminés présente un poids moléculaire de 53 kDa lorsqu'elle est immature (Febbraio *et al.* 2001) et une

fois glycosylée, elle possède un poids moléculaire de 88 kDa. Sa structure générale est composée de deux domaines transmembranaires séparés par un large domaine extracellulaire (Connelly *et al.* 1999). Le CD36 est exprimé dans une variété tissulaire et cellulaire dont les monocytes/macrophages (Talle *et al.* 1983), les cellules endothéliales (Greenwalt *et al.* 1992), les adipocytes (Abumrad *et al.* 1993), les muscles squelettiques (Luiken *et al.* 2000), le cœur (Bodart *et al.* 2002) et les plaquettes (Li *et al.* 1993). De plus, le CD36 est également exprimé au niveau du foie mais une étude immunocytochimique a démontré que cette expression était restreinte aux cellules endothéliales et aux cellules de Kupffer (Maeno *et al.* 1994). Nos travaux réalisés sur des cellules hépatiques parenchymateuses humaines (HepG2) et murines ont toutefois révélé la présence de CD36 (Lapointe *et al.* 2006). Étant un récepteur *scavenger*, le CD36 peut lier une multitude de ligands tels que les phospholipides anioniques (Rigotti *et al.* 1995), les cellules apoptotiques (Ren *et al.* 1995), les acides gras à longue chaîne (Abumrad *et al.* 1998) et les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* (Oquendo *et al.* 1989). Au niveau cellulaire, le CD36 se localise dans les cavéoles et les radeaux lipidiques (Babitt *et al.* 1997). À priori, le CD36 a été reconnu comme étant un récepteur de LDLox (Endemann *et al.* 1993) et un transporteur d'acide gras (Chen *et al.* 2001), mais on lui reconnaît également la capacité de lier les lipoprotéines natives comme les HDL, VLDL, et LDL (Calvo *et al.* 1998).

Implication de CD36 dans la captation globale des LDLox

En 1993, Endemann et ses collaborateurs furent les premiers à identifier le CD36 comme un récepteur potentiel pour les LDLox (Endemann *et al.* 1993). Depuis, des études *in vitro* ont corroboré ces résultats. Effectivement, une étude employant des anticorps dirigés contre le CD36 montra une inhibition allant jusqu'à 60% de la liaison des LDLox à des macrophages humains (Nicholson *et al.* 1995). De plus, cette étude employa également des cellules transfectées par un vecteur permettant

l'expression de CD36, et les résultats indiquèrent une plus grande capacité (quatre fois plus) de liaison, d'internalisation et de dégradation des LDLox comparativement aux cellules transfectées avec le vecteur sans l'ADNc de CD36. Du côté des études réalisées avec des souris déficientes pour le gène CD36, les données confirment les résultats obtenus *in vitro*, plus précisément, la déficience pour le CD36 donnait lieu à une baisse significative de la capacité de liaison, d'internalisation et de dégradation des LDLox par les macrophages (Febbraio *et al.* 1999) (Nicholson *et al.* 2000). Febbraio et ses collaborateurs (2000) travaillèrent avec des souris doublement déficientes pour les gènes CD36 et apoE. Leurs résultats indiquaient que ces souris présentaient 77% moins de lésions aortiques que les souris déficientes pour le gène de l'apoE seulement. Ceci démontre que l'absence de CD36 ralentit la progression des lésions aortiques. Plus encore, un polymorphisme génétique identifié dans la population asiatique montre une déficience dans l'expression du gène CD36. Les macrophages dérivés de ces patients lient 40% moins de LDLox et accumulent 40% moins d'esters de cholestérol (Nozaki *et al.* 1995). Ainsi, ces données supportent l'hypothèse que les macrophages sont des médiateurs précoces de l'athérogenèse et que le CD36 joue un rôle essentiel dans le processus d'athérosclérose. Au niveau du métabolisme des LDLox, il est connu que ces composés oxydés sont principalement métabolisés par le foie (Ling *et al.* 1997). Toutefois, le ou les récepteur(s) impliqué(s) dans leur métabolisme n'est (ne sont) pas encore identifié(s). Les données recueillies jusqu'à maintenant suggèrent une contribution du récepteur CD36 et une implication du foie dans le métabolisme des LDLox. Ainsi, il est possible de penser que le CD36 hépatique est responsable de l'élimination de ces lipoprotéines oxydées. Puisqu'il n'y a encore aucune étude publiée sur le rôle *in vivo* de CD36 dans l'élimination des LDLox, il devient intéressant d'étudier la clairance des LDLox chez les souris sauvages et déficientes pour le CD36.

3.3 Captation sélective

L'homéostasie cellulaire de cholestérol implique des échanges dynamiques entre les lipoprotéines et les cellules par l'action interposée de récepteurs. Il existe une voie dans laquelle le cholestérol des lipoprotéines est capté sans toutefois amener la dégradation complète de la lipoprotéine, c'est la voie de la captation sélective. La captation sélective peut être vue comme étant un mécanisme de délipidation des lipoprotéines puisque ce processus consiste en l'extraction du cholestérol et des EC des lipoprotéines sans amener la dégradation de la partie protéique, les apoprotéines. Plusieurs études ont démontré l'existence de la captation sélective des EC dans une grande variété cellulaire et tissulaire. Chez le rat, la captation sélective des EC a été démontrée *in vivo* principalement dans les reins, les ovaires et le foie, et *in vitro* avec des cellules rénales et des hépatocytes (Glass *et al.* 1985). Selon cette étude, le foie serait le majeur organe impliqué dans la captation sélective des EC des HDL, et les tissus stéroïdogènes auraient une implication de second ordre. Chez l'humain, les cellules HepG2 (Granot *et al.* 1987) (Brissette et Falstrault 1992), les hépatocytes (Fluiter *et al.* 1998), les adipocytes (Benoist *et al.* 1997) et les fibroblastes (Pittman *et al.* 1987) ont révélé une capacité de prendre les EC par la voie de captation sélective. Il est à noter que la plupart des études réalisées sur cette voie ont principalement porté sur les HDL. La Professeure Brissette et son équipe furent les premiers à rapporter qu'il existe une voie de captation sélective pour les EC provenant de lipoprotéines à apoB. En effet, cette équipe a démontré ce phénomène envers les IDL en 1994 et envers les LDL en 1996 (Brissette et Falstrault 1994) (Brissette *et al.* 1996). Il est maintenant connu que le récepteur *scavenger* de classe B type I (SR-BI) est impliqué dans ce processus (Rhainds *et al.* 2003).

Récepteur scavenger de classe B type I

Le SR-BI est une protéine monomérique glycosylée de 85 kDa formée de 509 acides aminés constituant un poids moléculaire de 57 kDa. Le SR-BI a été découvert chez le rongeur en 1994 par l'équipe de Krieger (Acton *et al.* 1994), mais son homologue humain, le *CD36- and LIMP2 Analogous-1* (CLA-1), fut découvert en 1993 par l'équipe de Vega (Calvo et Vega 1993). Sa structure générale ressemble à celle de CD36, c'est-à-dire qu'elle est composée de deux domaines transmembranaires reliés par une large portion extracellulaire (Cao *et al.* 1997). Cette protéine est principalement exprimée dans le foie et les tissus stéroïdogènes (Gu *et al.* 1998). Ce récepteur *scavenger* reconnaît plusieurs ligands dont les HDL natives, les LDL natives et modifiées, les VLDL (Swarnakar *et al.* 1999), l'apoA-I, l'apoA-II, l'apoC-III (Xu *et al.* 1997). Au niveau cellulaire, le SR-BI est situé dans les cavéoles, des invaginations de la membrane plasmique de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les adipocytes, les hépatocytes, les cellules endothéliales et épithéliales pour n'en nommer que quelques-uns (Razani et Lisanti 2001) (Balbis *et al.* 2004). Sa localisation au niveau des cellules hépatiques parenchymateuses diffère puisque notre groupe a plutôt démontré sa présence au niveau des radeaux lipidiques (Rhainds *et al.* 2004). Les microdomaines cavéolaires et les radeaux lipidiques sont impliqués dans plusieurs phénomènes de transport et de signalisation cellulaires, mais ils joueraient également un rôle dans le transport des lipides entre les lipoprotéines et les cellules (Babitt *et al.* 1997). Leurs présences ne semblent pas nécessaires à l'activité du SR-BI puisque une récente étude réalisée *in vitro* avec des cellules rénales humaines a démontré que le SR-BI était en mesure de capter sélectivement les EC des HDL même en absence de cavéoles (Briand *et al.* 2003).

Implication de SR-BI dans la captation sélective des EC de lipoprotéines natives

Plusieurs études ont déjà démontré la participation du SR-BI dans le métabolisme des lipoprotéines natives, et plus particulièrement pour les HDL. Des études réalisées *in*

vitro ont montré que le SR-BI possède une haute affinité pour les HDL, et détient la capacité de prendre sélectivement les EC des HDL indépendamment de la voie utilisant le rLDL (Ueda *et al.* 1999). Des études effectuées *in vivo* chez des modèles murins surexprimant le SR-BI au niveau hépatique ont démontré une diminution des niveaux de HDL plasmatiques et une augmentation de la sécrétion biliaire de cholestérol (Kozarsky *et al.* 1997). Ceci indique que le SR-BI est impliqué *in vivo* dans le métabolisme des HDL et la sécrétion du cholestérol au niveau hépatique. De plus, une étude du groupe de Krieger effectuée sur des souris déficientes pour le gène SR-BI a montré que la déficience pour le SR-BI provoque un taux plasmatique élevé de cholestérol, voir deux fois plus que chez les souris sauvages, et une altération dans la structure des lipoprotéines se présentant plus hétérogènes, grosses et enrichies en apoE (Rigotti *et al.* 1997). Ces études prouvent le rôle du SR-BI dans la clairance plasmatique de cholestérol et suggèrent fortement une implication du SR-BI dans la prise sélective des EC des HDL.

La capacité du récepteur SR-BI à lier d'autres lipoprotéines natives a également été investiguée. Des analyses effectuées *in vitro* ont effectivement démontré que le SR-BI humain (CLA-1) pouvait lier les VLDL et les LDL en plus des HDL (Calvo *et al.* 1997). En plus de lier les LDL, le SR-BI capterait sélectivement les EC des LDL. Toutefois, la captation sélective des EC à partir des LDL serait beaucoup moins efficace (de l'ordre de 6 à 18 fois moins) que la captation sélective des EC des HDL (Swarnakar *et al.* 1999) (Webb *et al.* 2002). En 1998, Wang et ses collègues (1998) furent les premiers à démontrer *in vivo* chez un modèle murin que le SR-BI joue un rôle dans la détermination des niveaux d'apoB. Cette étude indiqua qu'une surexpression du SR-BI au niveau hépatique réduit significativement les concentrations plasmatiques d'apoB et d'esters de cholestérol des VLDL et LDL. Une autre étude *in vivo* menée par Ueda et ses collaborateurs (1999) présente une clairance accrue des LDL chez les souris surexprimant le SR-BI. Cependant, les résultats de Webb et ses collègues (2002) quant à la surexpression hépatique du SR-

BI indiquèrent une modeste capacité à la captation sélective de EC des LDL, et pas d'effet sur le catabolisme des apoB. En regard de ces différentes études, il demeure évident que l'implication du SR-BI dans le métabolisme des VLDL et des LDL restait à être mieux définie afin de déterminer l'importance de ce récepteur dans l'athérogenèse. Les travaux de notre laboratoire ont clairement indiqué que le SR-BI est impliqué dans 75 à 85 % de la captation sélective des EC des LDL et des HDL dans les cellules HepG2 (hépatomes humains) et les cellules hépatiques murines (Rhainds *et al.* 2003). D'autre part, des études de clairance des EC de LDL et HDL réalisées chez des souris sauvages et déficientes (*knock out*) en SR-BI ont démontré l'implication du SR-BI dans ce processus (Brodeur *et al.* 2005). Toutefois, puisqu'une certaine fraction de la captation sélective à partir des LDL est apparente dans les souris totalement déficientes en SR-BI, on doit conclure que d'autres récepteurs ou protéines sont impliqué(e)s.

Implication de CD36 dans la captation sélective des EC de lipoprotéines natives

Des études *in vitro* montrèrent que le CD36, tout comme le SR-BI, possède la capacité de lier les HDL avec une haute efficacité. Cependant, le SR-BI demeure plus efficace pour la captation sélective de EC des HDL (7 à 10 fois plus) que le CD36 (Connelly *et al.* 1999) (de Villiers *et al.* 2001). De plus, il semblerait que la captation des EC des HDL par le CD36 est dépendante de la liaison aux molécules de HDL puisqu'une incapacité à lier les HDL amènerait aussi une incapacité à prendre sélectivement les EC des HDL (Connelly *et al.* 1999). Le groupe de Krieger a également montré que le CD36 humain liait les HDL avec une forte affinité mais leurs données reliées à la captation sélective des EC des HDL furent négatives pour le CD36 comparativement aux résultats obtenus avec le SR-BI (Gu *et al.* 1998). Des analyses de liaison et de captation sélective ont été effectuées avec le SR-BI murin, le CD36 provenant du rat et des compositions chimériques des deux molécules. Les résultats obtenus démontrent que la partie extracellulaire du SR-BI est essentielle pour la captation sélective efficace des HDL et que la portion C-terminale du

récepteur peut fortement influencer le processus de captation sélective (Connelly *et al.* 1999). Contrairement aux analyses de surexpression effectuées avec le SR-BI, les analyses *in vivo* sur la surexpression hépatique de CD36 ne démontrèrent pas d'effets notoires sur les concentrations de HDL, et ce, malgré une surexpression substantielle (de Villiers *et al.* 2001). Cette même équipe étendit leur étude sur le métabolisme des LDL et leurs résultats indiquèrent une faible affinité de liaison de CD36 pour les LDL, ceci suggérant que le CD36 ne soit pas un récepteur physiologique pour les LDL. Cependant, il ne faut pas oublier que les LDL sont en très faible concentration chez la souris et que des études de clairance *in vivo* sont nécessaires afin de nous assurer de l'absence d'un rôle du CD36 dans le catabolisme des LDL. Quant à eux, Calvo et ses collègues (1998) ont trouvé que le CD36 humain exprimé dans des cellules humaines et d'insectes, lie les LDL avec une forte affinité. De plus, une étude réalisée par Connelly et son équipe (2003) indiqua que le CD36 a une capacité équivalente au SR-BI pour effectuer la captation sélective des EC à partir des LDL. Selon ces études, il est clair que le rôle de CD36 dans le métabolisme des lipoprotéines natives n'est pas encore totalement élucidé.

Implication de SR-BI et de CD36 dans la captation sélective des EC de LDLox

La captation sélective des EC de lipoprotéines modifiées a d'abord été établie avec les HDL oxydées. Effectivement, l'équipe de van Berkel (Fluiter *et al.* 1996) a démontré *in vitro* et *in vivo* la captation sélective des EC oxydés de HDL par les cellules parenchymateuses de rat. En utilisant la lignée cellulaire CHO (*Chinese hamster ovary*) surexprimant le SR-BI, ce même groupe de chercheurs a démontré la contribution de SR-BI dans ce processus (Fluiter *et al.* 1999). Par l'emploi du même type cellulaire surexprimant le SR-BI, Gillotte-Taylor et ses collègues (2001) n'ont pu démontrer l'implication du SR-BI dans la captation sélective des EC des LDLox. Cependant, il est à noter que ces études ont été réalisées avec des cellules non-hépatiques, et que le comportement cellulaire peut différer d'un type cellulaire à l'autre. L'équipe du professeur Brissette fut la première à démontrer la captation

sélective des EC provenant des LDL modifiées (LDLac et LDLox) par des cellules hépatiques HepG2 (Rhainds *et al.* 1999). De plus, leurs résultats démontrèrent que cette captation sélective serait attribuable à un ou des récepteur(s) *scavenger(s)* de classe B, soit SR-BI et/ou CD36. Compte tenu des données recueillies jusqu'à ce jour, il serait envisageable de penser que le SR-BI serait impliqué au niveau de la captation sélective des EC des HDL modifiées, tandis que le CD36 aurait davantage une implication dans la captation sélective des EC des LDL modifiées.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'athérosclérose est fortement associée à de hauts niveaux de LDL plasmatiques natives. Certaines études suggèrent l'implication du récepteur CD36 dans le métabolisme des LDL natives mais aucune étude n'a fait état, jusqu'à présent, de la contribution physiologique de ce récepteur dans le métabolisme de ces lipoprotéines. Ainsi, l'un des objectifs principaux du présent projet visait à élucider l'implication physiologique du récepteur CD36 dans le métabolisme des lipoprotéines de faible densité natives. Une étude comparative a été réalisée par l'emploi de souris transgéniques déficientes pour le gène CD36 (-/-) et de souris sauvages exprimant normalement le CD36 (+/+) pour servir de contrôles. Le métabolisme des LDL natives a été évalué en établissant les paramètres de clairance plasmatique des parties protéique et lipidique des lipoprotéines afin de vérifier si les LDL se métabolisent via la voie de la captation globale ou par la captation sélective. Pour ce faire, des LDL marquées radioactivement en leur portion protéique ou lipidique ont été injectées à des souris sauvages et CD36 (-/-) et des prélèvements sanguins ont été effectués pour tracer les courbes de clairance plasmatique.

Un autre objectif important de l'étude portait sur la vérification de l'effet d'oxydation des LDL sur leur métabolisme, en présence ou en absence de CD36, car plusieurs évidences montrent une implication des LDL oxydées dans la formation des plaques d'athéromes reliées à l'athérosclérose. Cette partie de l'étude a également été réalisée par des analyses de clairances plasmatiques de LDL oxydées à différents degrés. L'élimination des parties protéique et lipidique de LDL légèrement oxydées (LOX) et fortement oxydées (FOX) par le cuivre a été examinée chez des souris CD36 (+/+) et (-/-). Nous avons aussi tenté de déterminer l'implication du récepteur SR-BI dans le métabolisme *in vivo* des LDL oxydées car des résultats de notre laboratoire ont démontré que ce récepteur pouvait jouer un rôle potentiel dans la captation sélective

des EC provenant de LDL modifiées. Certaines données récentes de notre laboratoire ont indiqué une implication de ce récepteur au niveau du métabolisme de LDL fortement oxydées et l'absence de sa contribution dans le métabolisme des LDL légèrement oxydées (Bourret *et al.* 2006). Étant donné que ces résultats ont montré une disparition rapide des LDLox, nous avons ici tenté d'étudier le métabolisme des LOX selon une méthode d'injection différente qui permettait le ralentissement de la clairance de ces lipoprotéines et qui pouvait offrir une meilleure appréciation du rôle de ce récepteur. L'évaluation de l'implication du récepteur SR-BI a également été réalisée par une étude comparative entre des souris de type sauvage exprimant normalement le SR-BI (+/+) et des souris déficientes pour le SR-BI (-/-).

Enfin, la contribution hépatique dans le métabolisme des LDL natives et oxydées était aussi un but visé dans le projet. Pour ce faire, le foie des souris a été prélevé suite aux analyses de clairances plasmatiques, et leur contenu en lipoprotéines radioactives a été mesuré pour évaluer la quantité de LDL natives ou oxydées métabolisées par cet organe.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MATÉRIEL

Le plasma humain utilisé pour l'isolement des lipoprotéines provenait de Innovative Research (Southfield, Michigan, USA). L'iode-125 [¹²⁵I], sous forme d'iodure de sodium (100 mCi/mL) et le [³H] cholestéryl oléyl éther (30-60 Ci/mmol) ont été achetés chez Amersham (Oakville, Ontario, Canada) et ICN Biomédical (Montréal, Québec, Canada), respectivement. Le sulfate de cuivre (CuSO₄) utilisé pour l'oxydation des LDL, ainsi que le barbital provenaient de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Les amorces, les nucléotides ainsi que la TAQ polymérase ont été obtenus de Amersham (Oakville, Ontario, Canada).

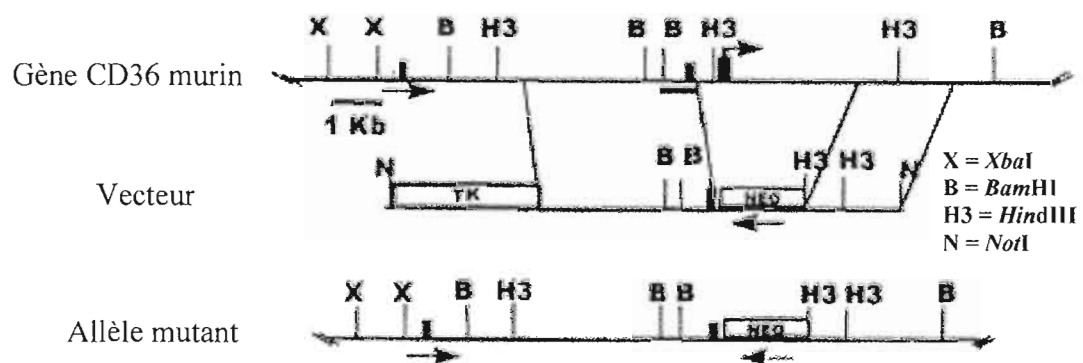
2. ÉLEVAGE ET GÉNÉRATION DES SOURIS

Les souris ont été soumises à des cycles de lumière régulés en une photopériode de 14 heures suivie d'une période d'obscurité de 10 heures afin de favoriser l'œstrus des femelles reproductives. Tout en favorisant la reproduction, ce cycle de lumière est recommandé par le comité institutionnel de la protection des animaux (CIPA). Ce comité a autorisé les différents protocoles de manipulations (# 0402-440-0405-S) nécessitant des animaux. La nourriture ainsi que l'eau ont constamment été disponibles pour les souris.

2.1 Génération des souris déficientes pour le récepteur CD36

Pour les expérimentations portant sur le récepteur CD36, les souris utilisées provenaient de nos propres colonies de souris sauvages (+/+) et déficientes en CD36 (-/-) dont les reproducteurs initiaux nous avaient été fournis par Dr. Febbraio (Cleveland, OH). L'équipe du Dr. Febbraio a effectué la génération des souris

déficientes en CD36 selon le principe de mutagenèse à partir de la souche murine initiale C57BL/6 (Febbraio *et al.* 1999). Brièvement, le gène CD36 murin a été inactivé par recombinaison homologue utilisant un vecteur de remplacement contenant une cassette néomycine (NEO) et une cassette thymidine kinase (TK) pour la sélection. Par cette stratégie, le 3^e exon codant pour les 40 premiers acides aminés de CD36 contenant la portion N-terminale du domaine transmembranaire de la protéine a complètement été amputé (figure 1). Les souris CD36 (-/-) générées présentaient un phénotype normal et une longévité normale, et les mâles ainsi que les femelles étaient fertiles. La vérification du génotype des souris produites a été réalisée selon la méthode de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dont les détails seront mentionnés dans une prochaine section.



(Febbraio *et al.* 1999)

Figure 1 : Mutagenèse utilisée pour la génération des souris déficientes pour le gène CD36. Structure génomique du gène CD36 murin, du vecteur recombinant ainsi que l'allèle mutant. Les boîtes noires représentent les exons 1, 2 et 3 (de gauche à droite) du CD36 murin et les flèches indiquent l'orientation de la transcription. La flèche recourbée indique le site de départ de la transcription du gène CD36. L'allèle mutant résultant se retrouve amputé du 3^e exon, il contient une cassette NEO positionnée en sens opposé de la transcription et il est raccourci de 1 kb.

2.2 Génération des souris déficientes pour le SR-BI

Les souris déficientes pour le SR-BI provenaient quant à elles de notre propre colonie de souris formée à partir de trois couples de souris hétérozygotes pour le SR-BI (+/-) provenant du Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Les souris déficientes en SR-BI ont également été générées selon le principe de mutagenèse et a aussi utilisé la souche murine initiale C57BL/6 (Rigotti *et al.* 1997). Selon cette stratégie, le premier exon codant du gène SR-BI est inactivé et la protéine produite se retrouve amputée de 42 acides aminés codant pour la région cytoplasmique N-terminale ainsi qu'une portion du domaine transmembranaire (figure 2).

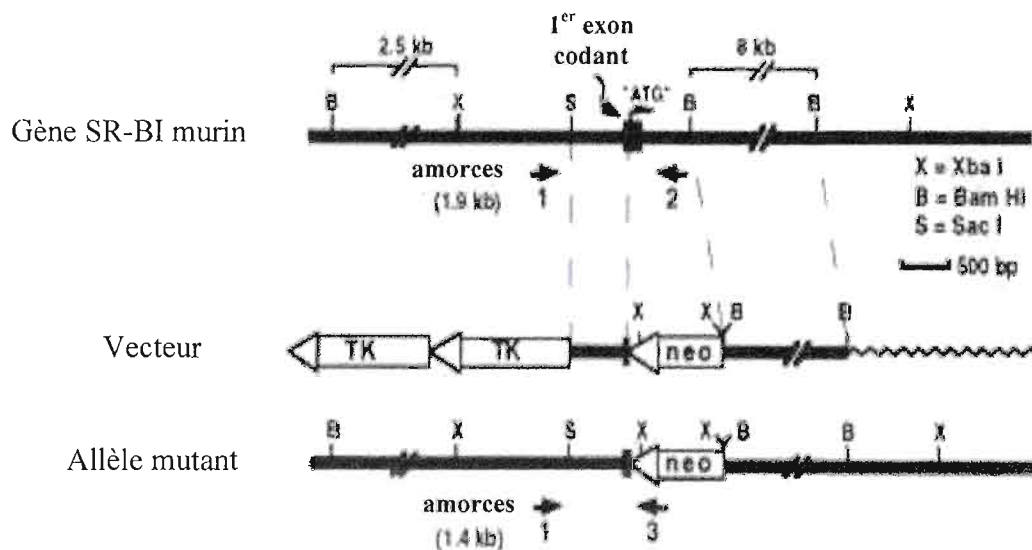


Figure 2 : Mutagenèse utilisée pour la génération des souris déficientes pour le gène SR-BI. Structure génomique du gène SR-BI murin, du vecteur recombinant ainsi que l'allèle mutant. Les positions des séquences d'amorces utilisées pour les PCR ainsi que la longueur des produits de PCR anticipés sont présentées sur le schéma. L'allèle mutant se retrouve amputé du premier exon codant, il contient une cassette NEO positionnée en sens opposé de la transcription et il est raccourci de 500 pb.

L'obtention des souris SR-BI (-/-) est plus laborieuse puisque les souris femelles SR-BI (-/-) sont infertiles. Ainsi, des croisements entre mâles SR-BI (-/-) et femelles (+/-) ont été effectués et le ratio moyen de souris déficientes obtenues était 30%. La vérification du génotype des souris SR-BI a été réalisée par la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) telle que décrite dans la section suivante.

3. RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE

3.1 Génotypage des souris CD36

Bien que les souris femelles CD36 (-/-) soient fertiles, le génotypage des souris sauvages et déficientes en CD36 a été effectué afin de s'assurer du génotype des souris générées lors des croisements. Le génotypage a été réalisé par la méthode de polymérisation en chaîne dont les conditions nous ont été fournies par l'équipe du Dr. Febbraio (Cleveland, OH). Plus précisément, la technique comprenait deux réactions PCR dont l'une servait à détecter l'allèle CD36 normale et l'autre à la détection de l'allèle CD36 mutant. Ainsi, deux couples d'amorces spécifiques à la détection des allèles ont été utilisés. Pour l'allèle CD36 normale, les amorces A et B ont été utilisées et les séquences étaient 5' - CAGTCATACATTGCTGTTTATGCATG - 3' et 5' - GGTACAATCACAGTGTTTTCTACGTGG - 3' respectivement. Dans le cas de l'allèle CD36 mutant, les amorces utilisées étaient les amorces A et C (5' - CGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATC - 3'). Le mélange réactionnel utilisé pour les deux PCR était constitué de 10 % d'un tampon à PCR, 0,2 mM de chaque nucléotide (dNTP), 0,16 µg/ml de chaque amorce nécessaire, 2,5 unités de TAQ polymérase et 2 µl d'ADN extrait à partir d'un poinçon d'oreille selon la méthode de Chen et Evans (Chen et Evans 1990). Afin de maximiser les réactions, 1,0 mM de magnésium a été ajouté au mélange. Les réactions PCR ont été effectuées à l'aide d'un Mastercycler Gradient (Eppendorf) et elles ont débuté par une première période de dénaturation de 2 minutes à 95°C suivis de 29 cycles comprenant une minute de dénaturation à 95°C,

d'une minute d'hybridation à 65°C et de 2 minutes d'élongation à 70°C. Les réactions se terminaient par une période d'élongation finale de 2 minutes à 70°C.

Pour évaluer le génotype des souris CD36, les produits des réactions à PCR ont été mis sur gel d'agarose 2 % et les bandes d'ADN amplifiées ont été révélées à l'aide de bromure d'éthidium. La révélation d'une bande unique de 600 pb provenant de la 1^{ère} PCR correspondait à une souris homozygote normale, donc de type sauvage alors que la présence d'une bande unique d'environ 700 à 750 pb provenant de la 2^e PCR correspondait à une souris homozygote déficiente pour le gène CD36. Un exemple est présenté à la figure 3.

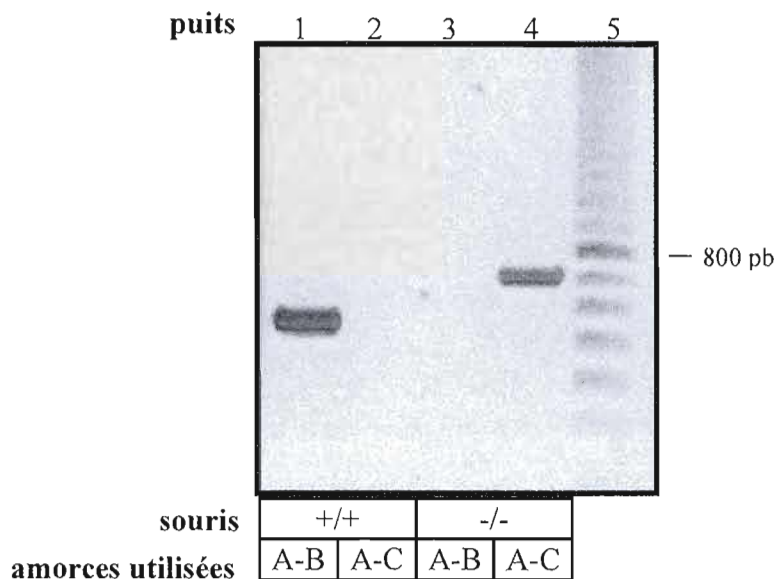


Figure 3 : Confirmation du génotype des souris CD36 par la méthode de réaction de polymérisation en chaîne. Les produits des PCR ont été mis sur gel d'agarose 2 %, et les bandes d'ADN ont été révélées à l'aide de bromure d'éthidium. Les puits 1 et 2 représentent les produits de PCR formés à partir d'ADN extrait d'une souris de type sauvage (+/+) et les puits 3 et 4 représentent les produits de PCR formés à partir d'ADN extrait d'une souris déficiente en CD36 (-/-). Le puits 5 représente un standard de poids moléculaire d'une échelle de 100 pb. Les amorces utilisées pour chacune des PCR sont également indiquées.

3.2 Génotypage des souris SR-BI

La méthode de polymérisation en chaîne utilisée pour génotyper les souris SR-BI est issue de la technique utilisée par le groupe de Krieger (Rigotti *et al.* 1997). La procédure impliquait deux réactions à PCR et nécessitait donc l'utilisation de deux couples d'amorces. La première PCR permettait de détecter l'allèle SR-BI normale et utilisait les amorces 1 et 2 dont les séquences étaient respectivement 5'- TGA AGG TGG TCT TCA AGA GCA GTC CT -3' et 5'- TAT CCT CGG CAG ACC TGA GTC GTG T -3'. La 2^e PCR utilisait les amorces 1 et 3 (5'- GAT TGG GAA GAC AAT AGC AGG CAT GC -3') pour la détection de l'allèle SR-BI mutant. Le mélange réactionnel pour les deux PCR comprenait une solution contenant 10% d'un tampon à PCR, 0,4 mM de chaque nucléotide (dNTP), 0,8 µg/ml de chaque amorce nécessaire, 2,5 unités de TAQ polymérase et 2 µl d'ADN extrait selon la technique de Chen et Evans (Chen et Evans 1990). Afin de maximiser la réaction, du magnésium a été ajouté à la 1^{ère} et à la 2^e PCR afin d'obtenir respectivement une concentration finale de 1,5 mM et 1,0 mM. Les réactions PCR ont été effectuées à l'aide d'un Mastercycler Gradient (Eppendorf) et ont été initiées par un cycle comprenant une période de dénaturation de 4 minutes à 95°C, de 2 minutes d'hybridation à 56,5°C suivie de 5 minutes d'élongation à 65°C. Les réactions se sont poursuivies durant 30 cycles comprenant une minute de dénaturation à 95°C, de 30 secondes d'hybridation à 56,5°C et de 2 minutes d'élongation à 65°C. Les réactions se terminaient par une période d'élongation de 10 minutes à 65°C.

L'évaluation du génotype fut réalisée en mettant les produits des 2 PCR sur un gel d'agarose à 1% et les bandes d'ADN amplifiés ont été révélées à l'aide de bromure d'éthidium. La révélation d'une bande de 2 kpb provenant de la première PCR indiquait la présence de l'allèle normale alors que la présence d'une bande d'environ 1,5 kpb issue de la 2^e PCR indiquait la présence de l'allèle mutante. La présence

d'une seule bande de 1,9 kpb correspondait à une souris homozygote normale alors qu'une seule bande de 1,4 kpb correspondait à une souris SR-BI homozygote déficiente. L'apparition des deux bandes correspondait à une souris hétérozygote. Un exemple est présenté à la figure 4.

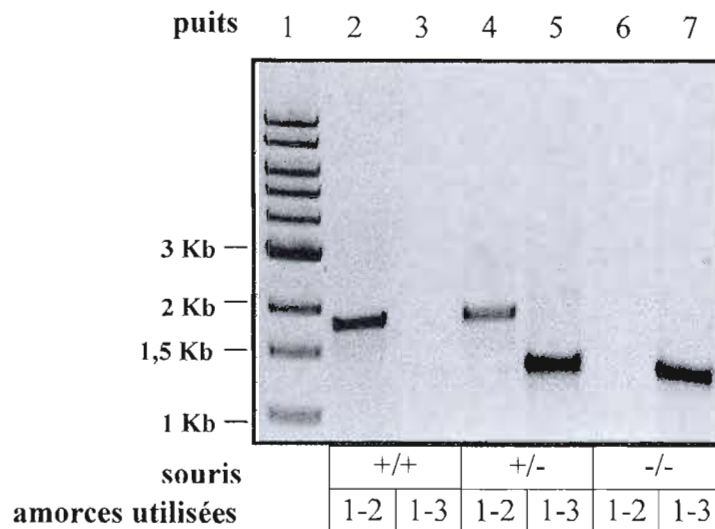


Figure 4 : Confirmation du génotype des souris SR-BI par la méthode de réaction de polymérisation en chaîne. Les produits des PCR ont été mis sur gel d'agarose 1 %, et les bandes d'ADN ont été révélées à l'aide de bromure d'éthidium. Le puits 1 représente un standard de poids moléculaire d'une échelle de 1 Kb. Les puits 2 et 3 représentent les produits de PCR formés à partir d'ADN extrait d'une souris de type sauvage (+/+), les puits 4 et 5 représentent les produits de PCR formés à partir d'ADN extrait d'une souris hétérozygote en SR-BI (+/-) et les puits 6 et 7 représentent les produits de PCR formés à partir d'ADN extrait d'une souris déficiente pour le SR-BI (-/-). Les amorces utilisées pour chacune des PCR sont également indiquées.

4. ISOLEMENT DES LIPOPROTÉINES

Les lipoprotéines utilisées lors des expérimentations ont été isolées à partir de plasma humain. Au plasma, des inhibiteurs de protéases : du fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF), de l'éthylène diamine tétraacétate (EDTA) et de l'azoture de sodium ont été ajoutés pour des concentrations finales respectives de 10 μ M, 0,01% et 0,02%, afin d'inhiber l'activité protéasique et d'éviter une contamination microbienne pour la préservation des lipoprotéines. Du bromure de sodium (NaBr) a été utilisé afin d'ajuster la densité du plasma et des solutions de lavage. Les lipoprotéines ont été isolées par centrifugation selon la méthode de Hatch et Lees (1968) avec les modifications de Brissette et collaborateurs (1996). De cette façon, les LDL humaines d'une densité allant de 1,025 à 1,063 g/ml ont été obtenues. La densité du plasma a d'abord été ajustée à 1,025 g/ml, et la préparation a été centrifugée à 2 000 000 g x h à 16°C. Le surnageant contenant des constituants du plasma ayant une densité inférieure à 1,025 g/ml a été retiré. Le sous-nageant a ensuite été ajusté à une densité de 1,063 g/ml et centrifugé à 2 300 000 g x h à 16°C. Les LDL se retrouvant à la surface ont été récupérées. Les LDL ont alors été lavées dans les mêmes conditions que durant l'isolement et ont ensuite été dialysées à 4°C dans une solution contenant 0,15 M de NaCl, 0,01% d'EDTA et 0,02 % d'azoture de sodium à pH 7,4.

5. MARQUAGE DES LIPOPROTÉINES

Selon le type d'expérimentation, les LDL ont été marquées avant ou après leur oxydation, mais la même procédure de marquage a été utilisée dans les deux situations. Les LDL ont été marquées dans leur partie protéique à 125 I selon la méthode de McFarlane (1958), modifiée par le groupe de Langer et collaborateurs (1972). Pour ce faire, un mCi de 125 I a été utilisé pour marquer 2,5 mg de lipoprotéines, en présence de 30 nmoles de monochlorure d'iode et 0,5 M de

glycine/NaOH à pH 10. L'iode libre a été enlevé par une filtration sur gel de Sephadex G-25, suivie d'une dialyse de 16-18 h dans du tampon tris-salin (TBS). Généralement, l'activité spécifique des ^{125}I -LDL était d'environ 1×10^5 cpm/ μg . Quant à la partie lipidique (EC) des lipoprotéines, celle-ci a été marquée selon la méthode de Roberts et collègues (1985) avec du $[^3\text{H}]$ -cholestérol éther (^3H -CEt). D'abord, 25 μCi de $[^3\text{H}]$ -cholestérol éther ont été évaporés sous azote et suspendus dans 250 μl d'acétone. Trois ml de sérum riche en CETP et dépourvu de lipoprotéines ont été ajoutés au mélange $[^3\text{H}]$ -cholestérol éther/acétone et évaporés de nouveau. Par la suite, 1 ml de lipoprotéines concentrées à 1 mg/ml a été ajouté au mélange contenant les EC marqués et le sérum dépourvu de lipoprotéines. L'ensemble a été incubé à 4°C pendant 30 minutes et a ensuite été centrifugé à $2\,300\,000 \text{ g} \times \text{h}$ à 16°C pour l'isolement des LDL marquées. L'activité spécifique moyenne des ^3H -CEt-LDL était d'environ 1×10^4 cpm/ μg .

6. OXYDATION DES LDL

L'oxydation des LDL a été selon le cas, réalisée avant ou après leur marquage radioactif. La méthode ayant été utilisée pour l'oxydation des LDL est celle présentée par Loughheed et Steinbrecher (1996). Cette méthode utilise 200 $\mu\text{g/ml}$ de LDL dilués dans du tampon tris salin (TBS) contenant 5 μM de CuSO_4 . Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C sous agitation légère. Les différents degrés d'oxydation ont été obtenus en variant la période d'incubation. Une forte oxydation (FOX) a été obtenue après 20 heures d'incubation tandis qu'une légère oxydation (LOX) a été obtenue après 4 heures d'incubation. L'oxydation a été arrêtée par l'ajout de 100 μM d'EDTA et de 40 μM d'hydroxytoluène butylé (BHT). Les LDL oxydées ont ensuite été caractérisées en évaluant leur mobilité relative par une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,5% contenant du barbital à 60 mM.

7. ANALYSE DU DEGRÉ D'OXYDATION DES LDL PAR GEL AGAROSE 0,5%/BARBITAL

Pour analyser le degré d'oxydation des LDL, 20 000 cpm de LDL non oxydées, et oxydées à différents degrés et marquées à ^{125}I ont été mis sur gel constitué d'agarose 0,5% /barbital 60 mM et ont subi une migration électrophorétique d'une durée d'une heure à 100 millivolts. Le gel a ensuite été solidifié durant 30 minutes dans une solution contenant 10 % d'acide acétique, 50 % de méthanol et 3 % de glycérol. Le gel a alors été séché pendant 20 minutes à 80°C et exposé sur film Kodak (Biomax ML) pendant 16 heures à -80°C. L'oxydation ayant pour effet d'augmenter la mobilité relative, plus les LDL sont oxydées, plus elles migrent dans le gel.

8. INJECTION *IN VIVO* DES LIPOPROTÉINES

La contribution du récepteur CD36 dans le métabolisme des LDL natives et oxydées a été évaluée *in vivo* par des essais de clairance. La clairance des LDL natives a été réalisée en injectant 20 µg de ces lipoprotéines marquées par l' ^{125}I ou par le ^3H -CEt et un bolus de 480 µg de LDL non marquées. L'ajout de ce bolus avait pour but de reproduire les concentrations humaines normales de LDL chez la souris puisque les LDL se retrouvent normalement en faible concentration chez cet animal. Les injections ont été effectuées par la veine de la queue, suivies de prises de sang de 50 µl par la veine saphène. Les prélèvements sanguins ont été récoltés dans des tubes héparinés à 2, 5, 10, 20, 30, 60 minutes et à 1, 3, 6 et 24 heures après l'injection de façon à bien visualiser la clairance des LDL natives. Par la suite, la souris fut sacrifiée et le foie prélevé pour analyser son contenu en radioactivité.

Les expériences de clairance des LDL oxydées ont été réalisées en injectant par la veine de la queue 50 µg de LDL oxydées marquées seules ou avec l'ajout d'un bolus. Un premier bolus de 450 µg de LDL oxydées non marquées a été choisi afin d'obtenir une même quantité totale de lipoprotéines injectées que dans l'étude de

clairance des LDL natives pour fin de comparaison. Le second choix de bolus de 1,45 mg a permis d'augmenter la quantité totale de lipoprotéines injectées dans le but d'obtenir une quantité suffisante de lipoprotéines pour ralentir la clairance des LDL oxydées et d'ainsi bien visualiser leur clairance. La clairance de ces lipoprotéines a été réalisée sur une période d'une heure où des échantillons sanguins de 50 µl ont été prélevés à 2, 5, 10, 20, 30 et 60 minutes. Après cette période, la souris fut sacrifiée et le foie fut excisé pour analyser son contenu en radioactivité.

9. ANALYSES PLASMATIQUES EN RADIOACTIVITÉ

Les échantillons sanguins contenant les LDL marquées à l'iode-125 (^{125}I -LDL) ont été centrifugés à 11 500 g durant 4 minutes à 4°C afin d'éliminer les globules rouges. Le plasma (surnageant) contenant les ^{125}I -LDL a été récupéré, et de l'albumine sérique bovine à 2% y a été ajoutée. L'échantillon a ensuite été soumis à une précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA) à 30% et à une centrifugation de 120 g pendant 15 minutes à 4°C. Cette étape avait pour but de précipiter les protéines et de laisser en solution l'iode libre provenant du métabolisme cellulaire des lipoprotéines marquées, étant donné que la méthode de marquage utilisée fut une méthode dégradable par les cellules. Les lipoprotéines retrouvées dans le culot ont alors été solubilisées avec 750 µl de NaOH à 0,2 N et la radioactivité γ a ensuite été comptée par un compteur Cobra II (Canberra-Packard). En ce qui concerne le plasma contenant les ^3H -CEt-LDL, la radioactivité β a directement été comptée par scintillation dans un compteur Tri-Carb 2800TR (Perkin Elmer) puisque ce produit radioactif sous forme d'éther est non-dégradable par les cellules.

10. MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ CONTENUE DANS LE FOIE

La radioactivité γ provenant des foies prélevés suite aux analyses de clairances plasmatiques utilisant ^{125}I a directement été mesurée dans le compteur Cobra II.

Dans le cas des foies récoltés contenant les ^3H -CET-LDL, ils furent d'abord préparés afin de pouvoir mesurer la radioactivité β par scintillation. La préparation de ces organes consistait en premier lieu par leur pesée et ensuite par leur broyage à l'aide d'un Polytron PT 3000 (Brinkmann Instruments). Un millilitre de chaque broyat a été utilisé pour l'extraction lipidique, auquel 7 ml de méthanol ainsi que 15 ml de chloroforme ont été ajoutés. Les échantillons furent ensuite homogénéisés et incubés pendant 40 minutes à 37°C. De l'eau déionisée (4,4 ml) fut ajoutée et la préparation gardée toute la nuit à 4°C. La phase supérieure et l'interphase ont été retirées et 10 ml d'un mélange H₂O-chloroforme-méthanol (47:3:48) ont été ajoutés à la phase organique restante. Des aliquots de la phase organique (phase inférieure) ont été séchés sous azote gazeux, dissous dans l'isopropanol et préparés pour la mesure de la radioactivité au compteur β .

11. ANALYSES GRAPHIQUES DE LA CLAIRANCE

Les études de clairance des lipoprotéines ont permis de recueillir des mesures de radioactivité à partir desquelles des courbes de clairance ont été tracées. Ces courbes ont été représentées en pourcentage de la radioactivité restante en circulation sur la radioactivité injectée initialement, en fonction du temps. C'est à partir de ces courbes que le taux catabolique fractionnel (TCF) des différentes lipoprotéines injectées a été calculé à l'aide du logiciel Sigma-plot. D'abord, il faut comprendre qu'une courbe de clairance correspond en fait à une courbe bi-exponentielle à partir de laquelle 2 droites exponentielles distinctes peuvent être obtenues. Le TCF dont l'équation est $y = 1 / (C_1/b_1 + C_2/b_2)$ représente donc l'inverse de l'addition de l'aire de chacune des droites et est exprimé en pools/unité de temps.

12. MÉTHODES STATISTIQUES ET AUTRES

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.* 1951). Les moyennes et les écarts-types ont été calculés pour chaque série d'expériences et ont été représentés en déviation standard de la moyenne (S.E.M.). Le test t de Student a été utilisé pour comparer les différentes données obtenues et une différence significative a été considérée lorsque $p < 0,05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

1. EFFET DE L'OXYDATION DES LDL SUR LEUR CLAIRANCE

L'oxydation des LDL dans la circulation sanguine constitue une phase critique dans le développement de l'athérosclérose. Effectivement, les esters de cholestérol provenant des LDL oxydées s'accumulent dans les macrophages via des récepteurs *scavenger* et forment une étape initiale dans la formation de plaques d'athéromes. L'épuration des LDL oxydées du courant sanguin s'avère donc d'une importance primordiale afin de minimiser la propension des maladies cardio-vasculaires. Ainsi, les objectifs de ce projet étaient de vérifier si l'oxydation des LDL à différents degrés affectait la clairance *in vivo* des LDL, et notamment d'évaluer le rôle de CD36 dans cette clairance. Pour ce faire, la partie protéique des LDL a d'abord été marquée à l'¹²⁵I et les lipoprotéines ont ensuite été oxydées durant 4 heures pour les LDL légèrement oxydées (LOX) et 20 heures pour les LDL fortement oxydées (FOX). La figure 5 montre la mobilité électrophorétique relative des LDL non oxydées et oxydées à différents degrés sur un gel agarose/barbital. Ce type de gel a permis la migration des différentes lipoprotéines selon leur degré d'oxydation. Selon cette figure, les LOX (puits 1) ont une charge moléculaire négative plus grande que celle des LDL non oxydées (puits 3) puisque leur mobilité relative est de 1,4 fois celle des LDL. En comparaison, les FOX (puits 2) dont la mobilité relative est 1,6 fois celle des LDL, possèdent une charge négative supérieure aux LDL non oxydées et aux LOX. Ces résultats indiquent tel qu'attendu, que plus les LDL sont oxydées, plus elles possèdent une charge moléculaire négative puisqu'elles migrent davantage vers l'anode du gel agarose/barbital. Ainsi nos conditions expérimentales ont généré des préparations de LDL ayant les critères désirés.

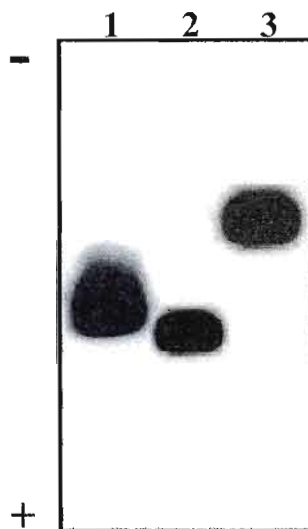


Figure 5 : Autoradiographie de la migration relative de LDL marquées à l' ^{125}I , non oxydées et oxydées à différents degrés. Vingt milles cpm de ^{125}I -LOX (1), de ^{125}I -FOX (2) et de ^{125}I -LDL (3) ont été déposés sur gel agarose/barbital. Le gel a ensuite été solidifié, séché selon la méthode décrite dans la section Matériel et Méthodes et exposé sur un film Kodak durant 16 heures à -80°C .

Ces lipoprotéines marquées au niveau de leur partie protéique à l' ^{125}I , non oxydées ou oxydées à différents degrés ont été injectées à des souris sauvages. La figure 6A présente la clairance plasmatique de ces différentes LDL et montre que l'élimination de la partie protéique des LDL natives est beaucoup plus lente que celle des LDL oxydées. Cette disparition plus rapide des LDL oxydées est en accord avec les études de l'équipe de Steinbrecher ayant utilisée des LDL fortement oxydées (Ling *et al.* 1997). Toutefois, leurs résultats laissaient déjà présager que ce type de disparition nous demanderait de faire des analyses en présence d'une quantité plus grande de ligands afin de ralentir le processus comme réalisé par Brodeur et collaborateurs (2005) pour des études de clairance de LDL natives. Dans ce cas, un bolus de 500 μg avait été utilisé. La figure 6B démontre qu'il nous est effectivement possible avec un tel bolus de ralentir la clairance des LDLox et que cette procédure permet de distinguer la vitesse de clairance des LDL selon leur degré d'oxydation. Effectivement, près de 85% de la dose injectée de ^{125}I -LDL se retrouve toujours dans

le plasma dix minutes après l'injection comparativement à environ 25 % pour les ^{125}I -LOX. La clairance de la partie protéique des FOX est d'autant plus rapide, voir presque qu'instantanée puisque près de la totalité de la dose injectée a disparue après cette période. Ainsi, il est possible de penser que les LDL oxydées sont plus rapidement dégradées.

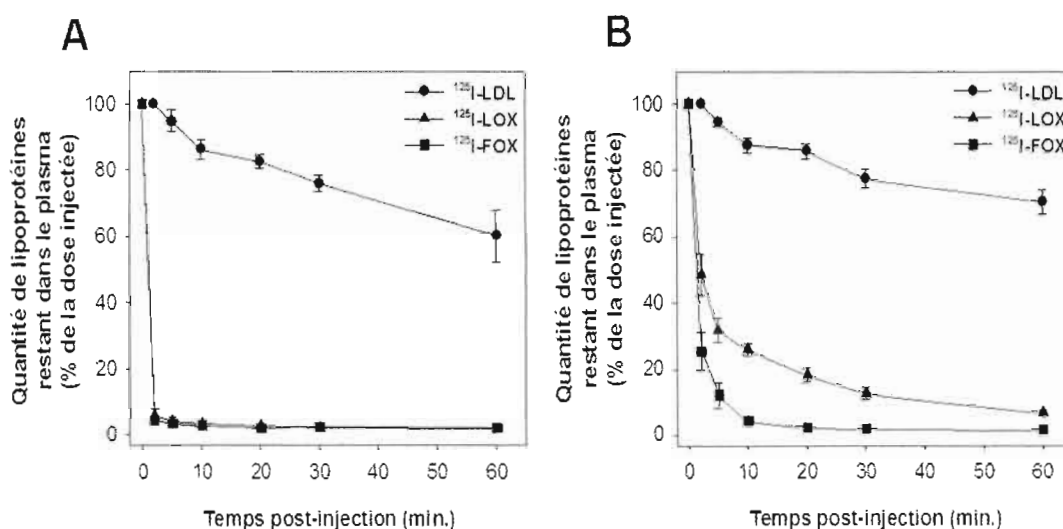


Figure 6 : Clairance plasmatique de ^{125}I -LDL (●) ^{125}I -LOX (▲) et ^{125}I -FOX (■) injectées chez des souris mâles sauvages. Cinquante μg de lipoprotéines marquées à l' ^{125}I sans (A) ou avec l'ajout d'un bolus de 450 μg de lipoprotéines non marquées (B) ont été injectés aux souris par la veine de la queue et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée selon la procédure décrite dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences.

2. IMPLICATION DE CD36 DANS LE MÉTABOLISME DES LDL NATIVES

2.1 Clairances plasmatiques des LDL natives

Un volet de l'étude était de vérifier si le récepteur *scavenger* CD36 avait une importance physiologique dans le métabolisme *in vivo* des LDL natives, tant au niveau de la captation globale qu'au niveau de la captation sélective. Pour ce faire,

des analyses de clairances plasmatiques de LDL marquées au niveau protéique à l' ^{125}I et marquées au niveau lipidique en ^3H -CEt ont été effectuées en utilisant la stratégie d'injection avec bolus. Étant donné qu'il existe une différence dans le métabolisme lipidique entre les mâles et les femelles (Mittendorfer 2005), les ^{125}I -LDL et ^3H -CEt-LDL ont été injectées par la veine de la queue à des souris femelles et mâles de type sauvage (+/+) et déficientes pour le CD36 (-/-). Des prélèvements sanguins échelonnés sur une période de 24 heures ont ensuite été effectués par la veine saphène. Chez les souris femelles de type sauvage (figure 7A), la vitesse d'élimination de la partie protéique des LDL est moins rapide que celle de la partie lipidique puisque trois heures après l'injection, près de 45 % de la dose injectée de ^{125}I -LDL reste présent dans la circulation sanguine comparativement à environ 15 % pour les ^3H -CEt-LDL. Ces données montrent que les LDL sont soumises au phénomène de captation sélective tel que démontré par les travaux de Brodeur et collaborateurs (2005). En comparaison aux souris sauvages, les clairances plasmatiques des ^{125}I -LDL et des ^3H -CEt-LDL sont pratiquement similaires chez les souris femelles déficientes en CD36 (figure 7B), mis à part la clairance de la partie protéique des LDL qui est légèrement plus rapide chez ce génotype que chez les souris sauvages. Le processus de captation sélective des LDL est donc également retrouvé chez les souris femelles CD36 (-/-).

La situation est similaire chez les souris mâles sauvages puisque les LDL sont aussi soumises à la captation sélective. Effectivement, on retrouve une élimination ralentie de la partie protéique des LDL chez ces souris (figure 7C) comparativement à la clairance de la partie lipidique des LDL. En somme, environ 45 % de la dose injectée de ^{125}I -LDL est toujours présent dans le plasma 3 heures après l'injection plutôt que les 20 % restant de la dose injectée de ^3H -CEt-LDL. Chez les souris mâles déficientes en CD36 (figure 7D), les LDL sont aussi prises par la voie de la captation sélective. Le phénomène est toutefois de moindre importance puisque la clairance des ^{125}I -LDL est plus rapide chez les souris CD36 (-/-) que chez les souris sauvages.

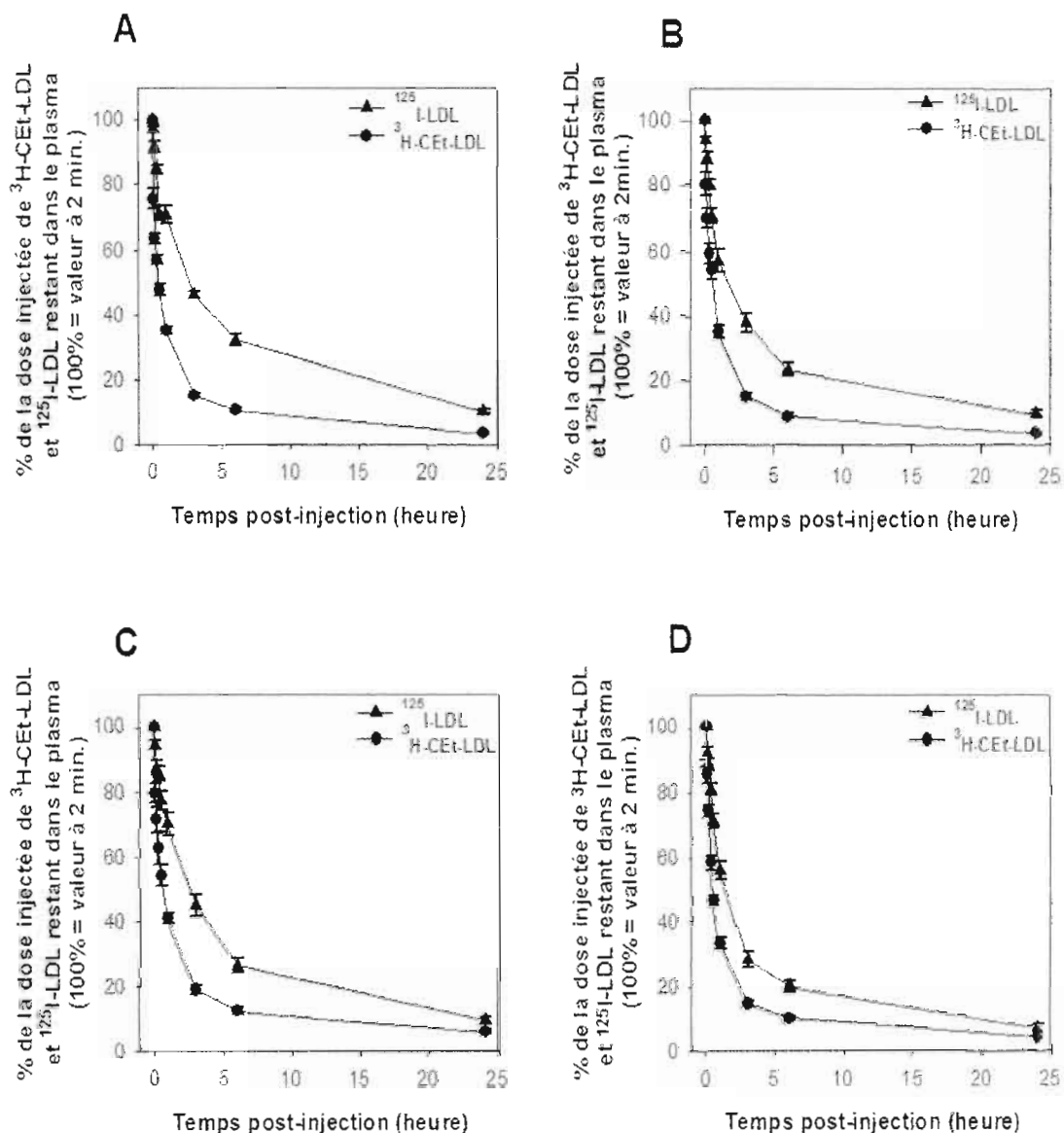


Figure 7 : Clairance plasmatique de $^{125}\text{I-LDL}$ (\blacktriangle) et $^3\text{H-CET-LDL}$ (\bullet) injectées chez des souris femelles (A et B) et mâles (C et D) sauvages (A et C) et déficientes en CD36 (B et D). Vingt μg de lipoprotéines marquées et 480 μg de LDL non marquées ont été injectés aux souris par la veine de la queue et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période de 24 heures. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée selon la procédure stipulée dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de six expériences.

2.2 Taux catabolique fractionnel des ^{125}I -LDL et ^3H -CEt-LDL

Les taux cataboliques fractionnels (TCF) des ^{125}I -LDL et des ^3H -CEt-LDL calculés à partir des courbes de clairances établies préalablement sont présentés dans le tableau III. Le TCF de la partie protéique des LDL (^{125}I -LDL) est significativement plus rapide chez les souris femelles CD36 (-/-) que chez les souris femelles sauvages. Il n'y a cependant aucune différence entre le TCF de la partie lipidique (^3H -CEt-LDL) entre les deux génotypes. En conséquence, il y a davantage de captation sélective notée chez les femelles sauvages que chez les femelles déficientes en CD36. Ces résultats sont donc en accord avec les données présentées dans les courbes de clairance (figures 7A et 7B) qui montraient de la captation sélective provenant des LDL chez ces souris.

Tableau III : Taux catabolique fractionnel (TCF) de ^{125}I -LDL et ^3H -CEt-LDL injectées à des souris femelles et mâles CD36 (+/+) et déficientes en CD36 (-/-). Vingt μg de LDL marquées et 480 μg de LDL non marquées ont été injectés aux souris par la veine de la queue et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période de 24 heures. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée et les courbes de clairances plasmatiques ont été tracées. Les TCF ont été calculés comme mentionné dans la section Matériel et Méthodes et sont exprimés en *pools*/heure. La captation sélective est démontrée lorsque la valeur de TCF des ^{125}I -LDL, soustraite à la valeur de TCF des ^3H -Cet-LDL, est plus grande que zéro. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de six expériences.

	Femelles		Mâles	
	+/+	-/-	+/+	-/-
^{125}I -LDL	0,124 \pm 0,004	0,160 \pm 0,007 ^a	0,143 \pm 0,016	0,183 \pm 0,012
^3H -CEt-LDL	0,324 \pm 0,013	0,328 \pm 0,023	0,232 \pm 0,021 ^b	0,290 \pm 0,017 ^a
^3H -CEt-LDL - ^{125}I -LDL	0,201 \pm 0,012	0,163 \pm 0,016 ^a	0,096 \pm 0,007 ^b	0,107 \pm 0,008 ^b

Légende: ^a : statistiquement différent ($p < 0,05$) des souris sauvages.

^b : statistiquement différent ($p < 0,05$) des femelles.

Chez les souris mâles, les TCF des parties protéique et lipidique sont plus élevés chez les mâles CD36 (-/-) que chez les souris mâles sauvages. Cependant, une différence significative n'est observée que dans le cas des TCF des ^3H -CEt-LDL. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre le TCF des mâles CD36 (-/-) et le TCF des femelles CD36 (-/-) pour les ^3H -CEt-LDL. Une différence significative est cependant perçue entre le TCF de la partie lipidique des LDL entre les souris mâles et femelles sauvages. Le phénomène de captation sélective est également retrouvé chez les souris mâles puisque le TCF de la partie lipidique des LDL est plus rapide que celui de la partie protéique. Ces données corroborent aussi avec les analyses de clairances précédentes (figure 7C et 7D). En somme, les LDL sont métabolisées par la voie de la captation sélective chez les souris femelles et mâles, mais le phénomène est de moindre ampleur chez les mâles. L'absence de CD36 a peu d'effet sur la captation sélective des LDL et indique que ce récepteur ne contribue pas au métabolisme des LDL natives par l'entremise de cette voie.

2.3 Contribution hépatique de CD36 dans la clairance des LDL natives

Suite aux analyses de clairances plasmatiques des différentes parties des LDL, les animaux ont été sacrifiés et leur foie récolté afin d'évaluer la contribution de cet organe, et notamment du récepteur CD36 dans l'élimination des LDL. La figure 8 montre la quantité de ^{125}I -LDL et de ^3H -CEt-LDL dans le foie des différentes souris analysées. De façon générale, la quantité de ^{125}I -LDL contenue dans les foies de souris est plutôt faible (~10 % de la dose injectée) en comparaison avec la quantité de ^3H -CEt-LDL (~ 45 % de la dose injectée). Ceci peut s'expliquer d'une part par le phénomène de captation sélective, mais aussi par le fait que contrairement au ^3H -CEt qui reste emprisonné dans la cellule, les petits peptides marqués à l' ^{125}I résultant de la dégradation protéique peuvent être sécrétés par la cellule. *

* Il est à noter que cette situation expérimentale n'affecte aucunement les résultats de clairances *in vivo* puisque le plasma subit une précipitation au TCA et que le surnageant qui contient ces produits de dégradation ne fait pas partie de la mesure de la radioactivité.

Une légère diminution de ^{125}I -LDL est retrouvée chez les souris CD36 (-/-) comparativement aux souris de type sauvage (+/+), mais cette différence n'est toutefois significative que chez les mâles. Globalement, ces résultats concordent avec les analyses de clairance de la figure 7 et indiquent que le foie contribue fort probablement, par la voie de la captation sélective, à l'élimination de la circulation sanguine des EC provenant des LDL.

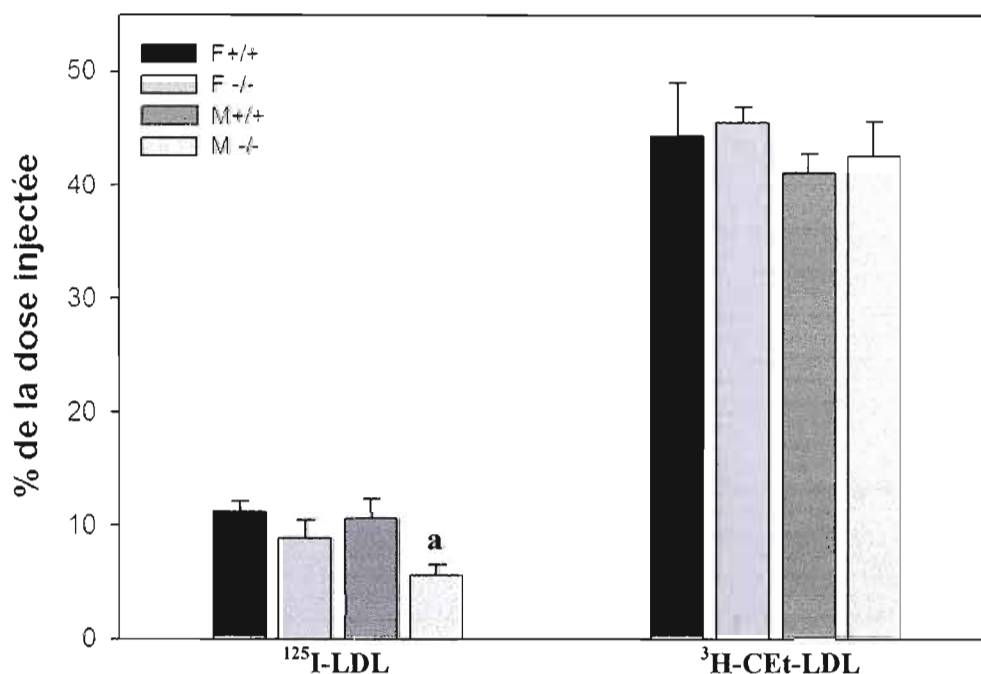


Figure 8 : Contribution hépatique de CD36 dans la clairance des ^{125}I -LDL et des ^3H -CET-LDL chez des souris femelles et mâles sauvages et déficientes en CD36. Vingt μg de ^{125}I -LDL ou de ^3H -CET-LDL et 480 μg de LDL non marquées ont été injectés aux souris par la veine de la queue et des analyses de clairance plasmatiques ont été effectuées sur une période de 24 heures. Le foie des animaux a ensuite été prélevé et son contenu en radioactivité a été analysé tel que mentionné dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de six expériences.

a statistiquement différent ($p < 0,05$) des souris sauvages.

3. IMPLICATION DE CD36 DANS LE MÉTABOLISME DES LDL OXYDÉES À DIFFÉRENTS DEGRÉS

L'oxydation des LDL est une étape initiale dans la formation de l'athérosclérose. La captation par des récepteurs *scavenger* et l'élimination des LDL oxydées sont donc primordiales. Le récepteur CD36 est un récepteur ayant montré la capacité de lier ces composés oxydés *in vitro*, son rôle dans le métabolisme *in vivo* des LDL oxydées a été étudié dans le cadre de mes travaux. Étant donné que peu de différences ont été notées entre les souris mâles et femelles lors de l'étude du métabolisme des LDL, nous avons poursuivi l'étude du métabolisme des LDL oxydées avec des souris mâles uniquement.

3.1 Rôle de CD36 dans la clairance plasmatique des LDL légèrement oxydées

Les LDL légèrement oxydées (LOX) ont été obtenues par une incubation de LDL natives marquées en ^{125}I ou en ^3H -CEt, avec du sulfate de cuivre (5 μM) pendant une période de 4 heures à 37°C. Afin de ralentir la clairance et de mieux évaluer le rôle de CD36, ces lipoprotéines et différentes quantités (0, 0,45, et 1,45 mg) de LOX non marquées (bolus) ont été injectées à des souris mâles sauvages et déficientes en CD36. Tel que démontré à la figure 9, l'élimination de la partie lipidique des LOX est très rapide chez les souris CD36 (+/+) car près de la totalité des lipoprotéines injectées a disparue de la circulation sanguine dix minutes après l'injection (figure 9A). Cependant, plus la quantité de LOX injectées augmente, plus la vitesse de clairance des ^3H -CEt-LOX est ralentie (figure 9B et 9C). Ce phénomène ne se manifeste toutefois pas pour la clairance des ^{125}I -LOX puisque leur disparition se fait pratiquement instantanément après l'injection (figures 9A), et ce, même avec une quantité accrue de LOX injectées (figures 9B et 9C). Ainsi, le phénomène de captation sélective n'est pas la principale voie employée ici pour l'élimination des LOX car la partie lipidique de ces lipoprotéines disparaît plus lentement que la partie protéique.

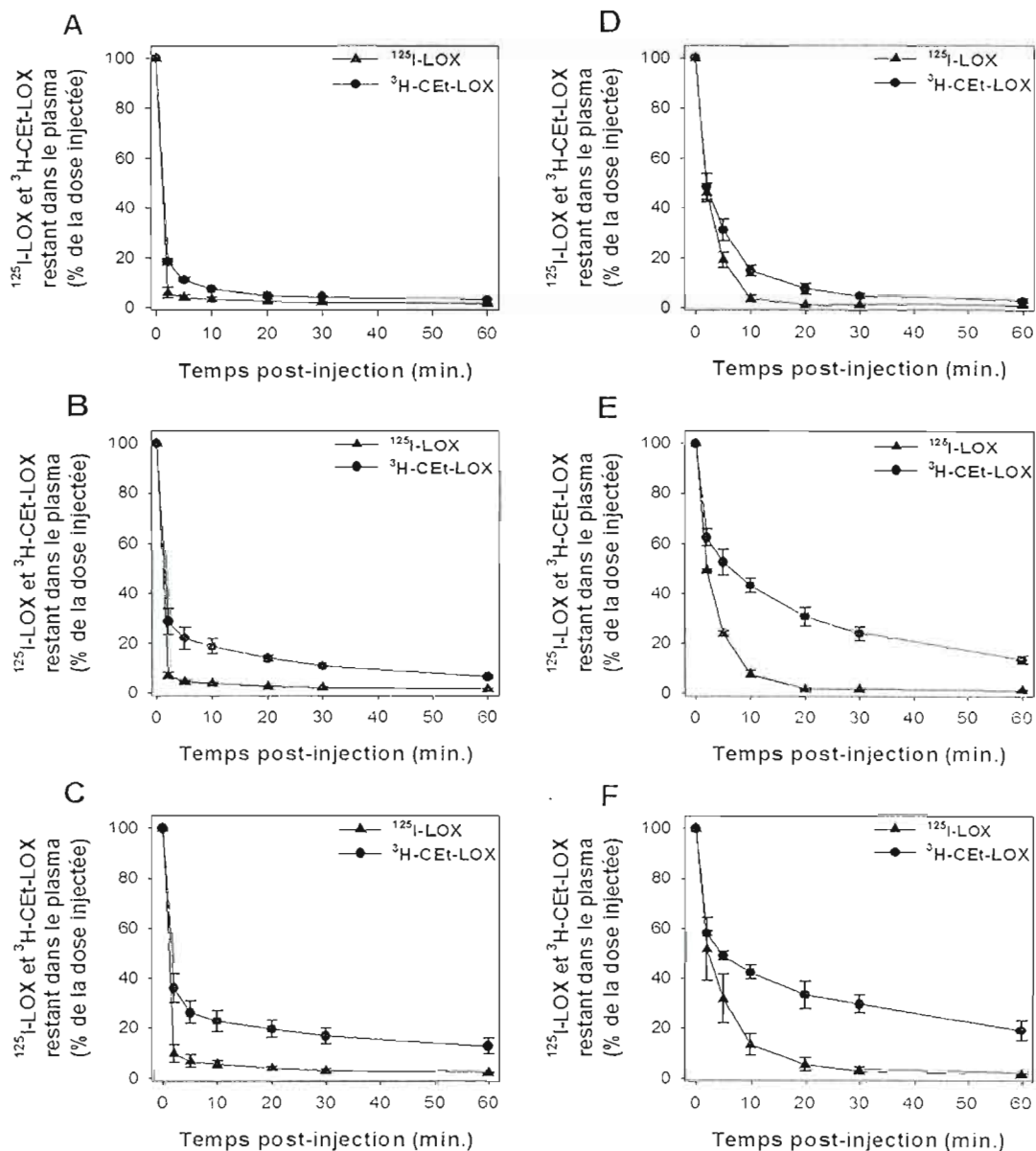


Figure 9 : Clairance plasmatique de ^{125}I -LOX (\blacktriangle) et ^3H -CET-LOX (\bullet) oxydées après le marquage radioactif et injectées chez des souris mâles sauvages (A, B et C) et déficientes en CD36 (D, E et F) selon différents bolus. Cinquante μg de lipoprotéines marquées sans bolus (A et D), avec un bolus de 450 μg (B et E) ou un bolus de 1,45 mg (C et F) de LOX non marquées ont été injectés aux souris par la veine de la queue et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée selon la méthode décrite dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences.

De façon générale, chez les souris déficientes en CD36 (figures 9D à 9F), la vitesse de clairance des $^3\text{H-CEt-LOX}$ est ralentie en comparaison avec celle des souris sauvages (figures 9A à 9C). De plus, le ralentissement de clairance de ces lipoprotéines est perçu davantage lors de l'ajout de 450 μg de LOX en bolus (figure 9E). Par contre, l'addition d'au-delà de cette quantité de bolus affecte peu la clairance des $^3\text{H-CEt-LOX}$ (figure 9F). La différence de clairance des $^{125}\text{I-LOX}$ est peu marquante entre les différents bolus injectés chez les CD36 (-/-), mais leur clairance est moins rapide que celle retrouvée chez les souris sauvages ce qui suggère une certaine implication de CD36 dans la captation globale des LOX et expliquerait le ralentissement de clairance des EC observé en absence de CD36.

3.2 Taux catabolique fractionnel de $^{125}\text{I-LOX}$ et $^3\text{H-CEt-LOX}$

Les taux cataboliques fractionnels calculés pour les $^{125}\text{I-LOX}$ et $^3\text{H-CEt-LOX}$ (tableau IV) confirment les données des courbes de clairance précédentes. En effet, les TCF des $^3\text{H-CEt-LOX}$ sont, chez les souris sauvages, plus faibles que les TCF des $^{125}\text{I-LOX}$ indiquant un ralentissement de clairance des $^3\text{H-CEt-LOX}$ comparativement aux $^{125}\text{I-LOX}$. De plus, l'ajout de bolus diminue la vitesse de clairance des $^3\text{H-CEt-LOX}$ car les TCF de ces lipoprotéines diminuent en fonction de l'addition de bolus. Cependant, ces bolus n'affectent pas la clairance des $^{125}\text{I-LOX}$ puisque les TCF de ces lipoprotéines ne diffèrent pas selon la quantité de lipoprotéines injectées. Contrairement aux LDL natives (tableau III), la captation sélective n'est donc pas la principale voie empruntée par ces LOX car les valeurs des TCF sont négatives en raison de l'élimination plus rapide des $^{125}\text{I-LOX}$ que des $^3\text{H-CEt-LOX}$.

Tableau IV : Taux catabolique fractionnel (TCF) de ^{125}I -LOX et ^3H -CEt-LOX injectées à des souris mâles CD36 (+/+) et déficientes en CD36 (-/-). Cinquante μg de lipoprotéines marquées sans bolus, avec un bolus de 450 μg ou un bolus de 1,45 mg de LOX non marquées ont été injectés et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée et les courbes de clairances plasmatiques ont été tracées. Les TCF ont été calculés comme mentionné dans la section Matériel et Méthodes et sont exprimés en *pools*/min. La captation sélective est démontrée lorsque la valeur de TCF des ^{125}I -LDL, soustraite à la valeur de TCF des ^3H -Cet-LDL, est plus grande que zéro. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences.

		^{125}I -LOX	^3H -CEt-LOX	^3H -CEt-LOX - ^{125}I -LOX
Sans Bolus	+/+	0,548 \pm 0,039	0,366 \pm 0,028	-0,182 \pm 0,011
	-/-	0,341 \pm 0,059 ^b	0,174 \pm 0,029 ^b	-0,167 \pm 0,030
Bolus 450 μg	+/+	0,584 \pm 0,028	0,103 \pm 0,003 ^a	-0,482 \pm 0,024 ^a
	-/-	0,283 \pm 0,018 ^b	0,048 \pm 0,005 ^{a,b}	-0,235 \pm 0,013 ^b
Bolus 1,45 mg	+/+	0,459 \pm 0,054	0,062 \pm 0,020 ^a	-0,397 \pm 0,035 ^a
	-/-	0,249 \pm 0,104	0,036 \pm 0,007 ^a	-0,213 \pm 0,099

Légende: ^a : statistiquement différent ($p < 0,05$) des expériences sans bolus.

^b : statistiquement différent ($p < 0,05$) des souris sauvages.

Les TCF des souris CD36 (-/-) sont de façon générale diminués comparativement aux TCF calculés pour les souris sauvages. Le TCF des ^3H -CEt-LOX injectées avec un bolus de 450 μg est significativement plus faible que celui des lipoprotéines injectées seules mais une plus grande quantité de bolus injectée a peu d'effet sur la clairance des ^3H -CEt-LOX. Les TCF des ^{125}I -LOX tendent à diminuer avec l'ajout de bolus mais cette tendance n'est pas significativement distincte entre les différents types d'injection. De même que chez les souris sauvages, les LOX ne sont pas principalement métabolisées par la voie de la captation sélective chez les souris déficientes en CD36 (-/-), mais plutôt par la voie de la captation globale. L'absence de CD36 ralentie les clairances des ^{125}I -LOX et des ^3H -CEt-LOX ce qui montre que ce récepteur est impliqué dans la voie de captation globale des LOX.

3.3 Contribution hépatique de CD36 dans le métabolisme des LDL légèrement oxydées

La contribution hépatique dans le métabolisme des LDL légèrement oxydées a été étudiée dans le but de vérifier l'implication de cet organe dans la clairance des LOX.* Du côté des souris sauvages (figure 10A), la quantité de ^{125}I -LOX contenue dans le foie des souris augmente proportionnellement selon la quantité de lipoprotéines injectées initialement. En effet, on retrouve respectivement 15 %, 20 % et 25 % de la dose initiale dans le foie des souris injectées avec 50 μg de LOX marquées seules, de celles injectées avec un bolus de 450 μg et celles avec un bolus de 1,45 mg. Ceci est peut-être dû à la loi d'action de masse. La quantité de ^3H -CEt-LOX retrouvée dans le foie est quant à elle de 18% pour les lipoprotéines marquées injectées seules, et de 23% pour les lipoprotéines injectées avec les 2 différents bolus. Selon les analyses statistiques, aucune différence significative n'est perçue entre les quantités de ^{125}I -LOX et de ^3H -CEt-LOX correspondantes. Ces résultats indiquent une absence de captation sélective provenant des LOX par le foie corroborant ainsi les données des courbes de clairance plasmatique (figure 9) et les TCF (tableau IV).

La quantité de ^{125}I -LOX contenue dans le foie des souris déficientes en CD36 (Figure 10B) est plus grande que dans le cas des souris sauvages puisque au niveau des lipoprotéines injectées seules, 28 % de la dose injectée est retrouvé comparativement à 15 % pour les souris sauvages. Cette tendance est également observée dans la situation où dix ou cent fois plus de lipoprotéines sont injectées mais la différence n'est toutefois significative que dans le cas où 500 μg de lipoprotéines sont injectés. Au niveau des ^3H -CEt-LOX, le foie des souris injectées avec ou sans bolus contient environ 28 % de la dose injectée. Cette quantité est supérieure à celle mesurée pour

* Il est à noter que dans le cas de cette expérimentation réalisée 1 heure après l'injection, la dégradation protéique est relativement minime comparée à celle de 24 heures réalisée précédemment pour les ^{125}I -LDL. Ainsi, les résultats de captation protéique sont peu affectés par cette composante métabolique.

les souris sauvages et est significativement différente dans le cas des lipoprotéines injectées seules et avec un bolus de 450 μ g.

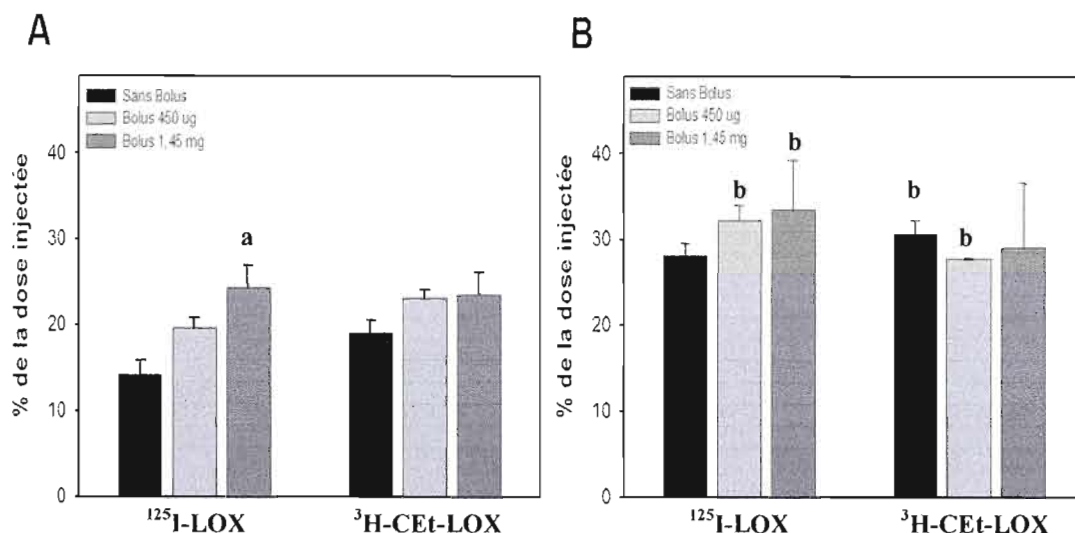


Figure 10 : Contribution hépatique du récepteur CD36 dans le métabolisme des LDL légèrement oxydés. Cinquante microgrammes de ^{125}I -LOX ou de ^3H -CET-LOX injectées seules, avec un bolus de LOX non marquées de 450 μ g ou un bolus de 1,45 mg ont été administrés à des souris mâles sauvages (A) et déficientes en CD36 (B). Des analyses de clairances plasmatiques ont été réalisées sur une période d'une heure et le foie des animaux a ensuite été récolté. Le contenu en radioactivité de chacun des foies a été analysé en suivant la procédure décrite dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences.
 a statistiquement différent ($p < 0,05$) des LOX injectées seules.
 b statistiquement différent ($p < 0,05$) des souris sauvages.

Tel que retrouvé pour les souris sauvages, les analyses statistiques ne montrent pas de différences significatives entre les quantités de ^{125}I -LOX et de ^3H -CET-LOX correspondantes captées par le foie. Ceci est en accord avec les résultats des courbes de clairance plasmatique (figure 9) et les TCF (tableau IV) qui indiquaient l'absence de captation sélective provenant de ces lipoprotéines. Ainsi, le foie est fortement impliqué dans la captation globale des LDL légèrement oxydés et l'absence de CD36 aurait tendance à augmenter ce processus.

3.4 Impact des méthodes de marquage radioactif et de l'oxydation des LOX sur leur clairance plasmatique

L'absence de captation sélective nous a étonné puisqu'une étude réalisée par notre groupe à partir de cellules primaires d'hépatocytes murins avait démontré de la captation sélective provenant des LOX chez des souris sauvages (Bourret *et al.* 2006). Nous avons donc testé une autre procédure consistant en une oxydation des LDL natives pendant 4 heures à 37°C en présence de cuivre, et d'un marquage subséquent en ^{125}I ou en ^3H -CEt (ordre inverse à la procédure précédente). Le terme LOX₂ sera ici utilisé pour différencier ces lipoprotéines des LOX analysées dans la section précédente. Cependant, les mêmes méthodes d'injection ont été utilisées pour les courbes de clairances plasmatiques des LOX₂ qui sont présentées à la figure 11.

Dans le cas des LOX₂ injectées seules chez les souris sauvages (figure 11A), la vitesse de disparition de la partie protéique est relativement rapide car la totalité de la dose injectée est éliminée 20 minutes après son administration. Cette clairance est toutefois ralentie lorsque la quantité de LOX₂ est augmentée à 500 µg (figure 11B), et l'est davantage à 1,5 mg (figure 11C). L'élimination des ^3H -CEt-LOX₂ injectées seules est presque instantanée et est plus rapide que la clairance des ^{125}I -LOX₂ injectées seules (figure 11A). Ceci montre que ces lipoprotéines, telles que préparées, sont soumises à la captation sélective. Ce phénomène demeure observable lorsque dix fois plus de lipoprotéines sont injectées (figure 11B) et est davantage marquée dans le cas où une plus grande quantité de LOX₂ est injectée (figure 11C).

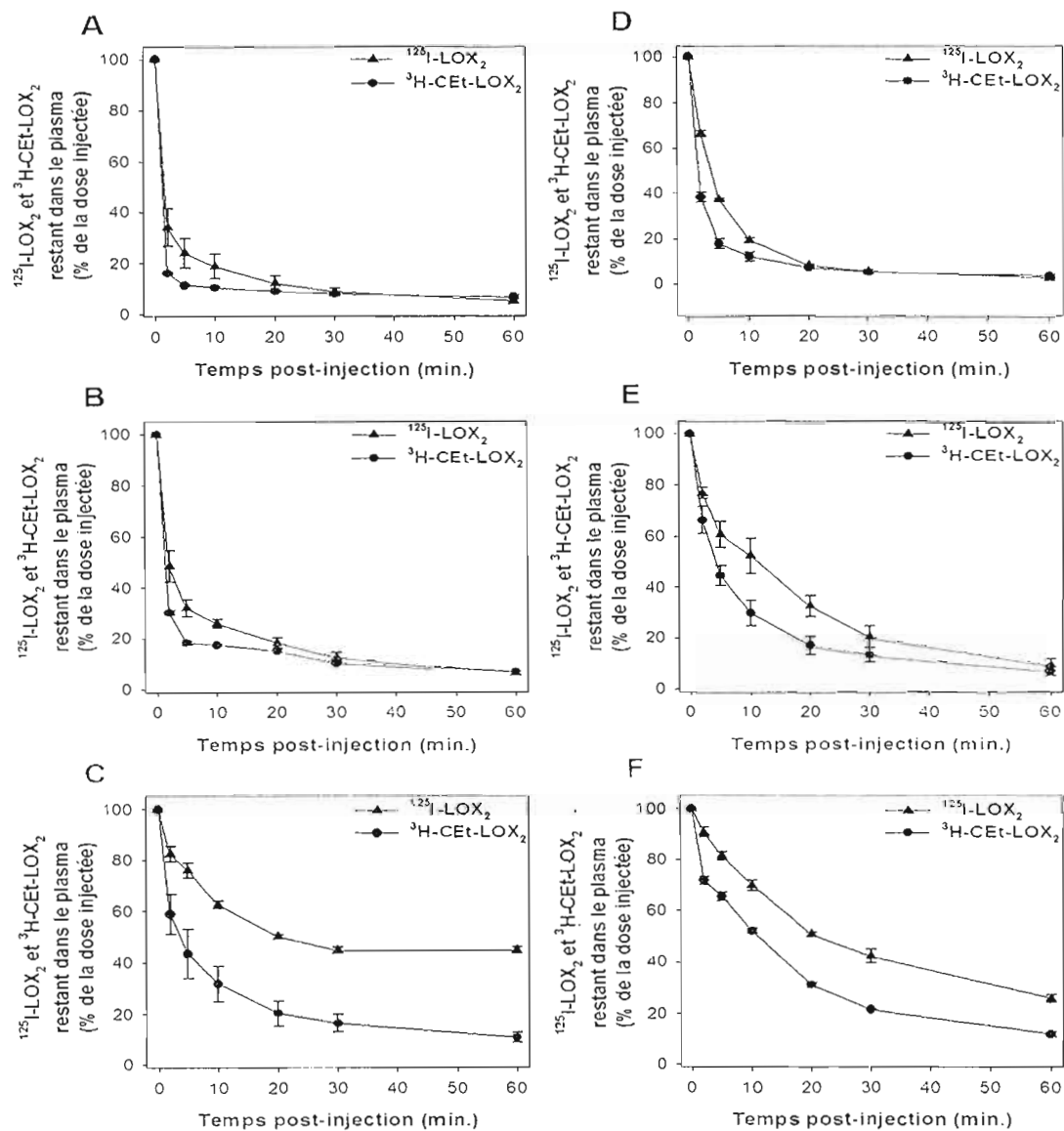


Figure 11 : Clairance plasmatique de ^{125}I -LOX₂ (▲) et ^3H -CET-LOX₂ (●) oxydées avant le marquage radioactif et injectées chez des souris mâles sauvages (A, B et C) et déficientes en CD36 (D, E et F) selon différents bolus. Cinquante μg de lipoprotéines marquées sans bolus (A et D), avec un bolus de 450 μg (B et E) ou un bolus de 1,45 mg (C et F) de LOX₂ non marquées ont été injectés aux souris par la veine de la queue et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée selon la procédure décrite dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne ± S.E.M. de trois expériences.

Pour les souris CD36 (-/-), il y a aussi de la captation sélective des LOX₂ car la partie lipidique des LOX₂ disparaît plus rapidement de la circulation sanguine que la partie protéique (figure 11D à 11F). Chez ce génotype de souris, la vitesse d'élimination des ³H-CEt-LOX₂ diminue selon l'addition de lipoprotéines injectées mais demeure moins importante que dans le cas des ¹²⁵I-LOX₂ (figures 11E et F). De plus, les clairances protéique et lipidique des LOX₂ chez les souris CD36 (-/-) sont ralenties en comparaison avec celles des souris sauvages.

3.5 Taux catabolique fractionnel de ¹²⁵I-LOX₂ et ³H-CEt-LOX₂

Pour les souris sauvages, les taux cataboliques fractionnels calculés (Tableau V) pour la partie protéique des LOX₂ (¹²⁵I-LOX₂) diminue de manière inversement proportionnelle à la quantité de lipoprotéines injectée. En effet, le TCF calculé pour les souris ayant été injectées avec 50 µg de LOX₂ est 1,3 fois et 5,5 fois plus grand, donc plus rapide, que le TCF calculé pour les souris ayant été injectées avec 500 µg et 1,45 mg de LOX₂ respectivement. Dans la même relation que pour la partie protéique des LOX₂, les TCF calculés pour la partie lipidique des LOX₂ diminuent lorsque la dose injectée augmente. Ainsi, le TCF des ³H-CEt-LOX₂ injectées seules est 1,1 fois et 1,8 fois plus grand que lorsque 500 µg et 1,5 mg de LOX₂ sont injectés. De plus, les valeurs de TCF des ³H-CEt-LOX₂ étant plus grandes que celles des TCF des ¹²⁵I-LOX₂, ces données sont en accord avec les résultats rapportés dans les courbes de clairance (figure 11A à 11C) et indiquent que ces lipoprotéines sont soumises à la voie de la captation sélective.

Comme retrouvé pour les souris sauvages, plus la quantité de LOX₂ injectées augmente chez les souris CD36 (-/-), plus la valeur des TCF des ¹²⁵I-LOX₂ diminue, et donc, plus la vitesse d'élimination de ces lipoprotéines ralentie. La même relation est perçue pour le TCF des ³H-CEt-LOX₂ car un léger ralentissement est effectivement remarqué pour les souris injectées avec 500 µg de LOX₂

comparativement à celles injectées avec 50 µg. Cependant, une différence significative est notée dans le cas des injections de 1,5 mg de LOX₂ puisque dans ce cas, les ³H-CEt-LOX₂ disparaissent deux fois moins rapidement. Les LOX₂ sont également soumises à la voie de la captation sélective chez ce génotype de souris car les TCF de la partie lipidique, plus grands que les TCF de la partie protéique, indiquent que la partie lipidique est éliminée plus rapidement que la partie protéique de ces lipoprotéines. L'absence de CD36 n'affecte pas le taux de captation sélective des LOX₂, indiquant que ce récepteur n'est pas impliqué dans ce processus. Par contre, la perte de CD36 ralentit la prise des parties protéique et lipidique des LOX₂ ce qui suggère un rôle de ce récepteur dans la voie de la captation globale de ces lipoprotéines.

Tableau V : Taux catabolique fractionnel (TCF) de ¹²⁵I-LOX₂ et ³H-CEt-LOX₂ injectées à des souris mâles CD36 (+/+) et déficientes en CD36 (-/-). Cinquante µg de lipoprotéines marquées sans bolus, avec un bolus de 450 µg ou un bolus de 1,45 mg de LOX₂ non marquées ont été injectés et 50 µl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée et les courbes de clairances plasmatiques ont été tracées. Les TCF ont été calculés comme mentionné dans la section Matériel et Méthodes et sont exprimés en *pools*/min. La captation sélective est démontrée lorsque la valeur de TCF des ¹²⁵I-LDL, soustraite à la valeur de TCF des ³H-Cet-LDL, est plus grande que zéro. Les valeurs représentées sont la moyenne ± S.E.M. de trois expériences.

		¹²⁵ I-LOX ₂	³ H-CEt-LOX ₂	³ H-CEt-LOX ₂ - ¹²⁵ I-LOX ₂
Sans Bolus	+/+	0,116 ± 0,011	0,124 ± 0,005	0,008 ± 0,007
	-/-	0,093 ± 0,008	0,103 ± 0,005	0,010 ± 0,003
Bolus 450 µg	+/+	0,086 ± 0,014	0,106 ± 0,008	0,020 ± 0,007
	-/-	0,054 ± 0,008 ^a	0,080 ± 0,015	0,035 ± 0,012
Bolus 1,45 mg	+/+	0,021 ± 0,001 ^{a,b}	0,068 ± 0,018 ^a	0,046 ± 0,017
	-/-	0,021 ± 0,002 ^{a,b}	0,052 ± 0,001 ^a	0,032 ± 0,001 ^a

Légende: ^a : statistiquement différent (p<0,05) des expériences sans bolus.

^b : statistiquement différent (p<0,05) des expériences avec un bolus de 450 µg.

3.6 Contribution hépatique de CD36 dans le métabolisme des LOX₁ et des LOX₂

Les résultats précédents de clairances plasmatiques ont montré que les LOX₂ sont éliminées différemment des LOX₁. Ainsi, nous avons d'une part évalué l'implication du foie dans le métabolisme des LOX₂ et d'autre part, nous avons comparé la contribution de cet organe dans le métabolisme des LOX₁ et LOX₂.

L'implication du foie dans le métabolisme des LOX₁ et LOX₂ a été analysée et les données sont rapportées à la figure 12. Tant du côté des souris sauvages que des souris déficientes pour le CD36, les LOX₂ ont davantage été captées au niveau hépatique que les LOX₁. Aucune différence n'est perçue entre la prise des parties protéique et lipidique pour les LOX₁ par le foie montrant que cet organe participe à la captation globale des LOX₁. Cependant, une plus grande quantité de ³H-CET-LOX₂ a été prise en charge que les ¹²⁵I-LOX₂ ce qui indique que le foie collabore à la prise sélective des EC provenant des LOX₂. Par contre, l'absence de CD36 amène une meilleure prise hépatique de la molécule LOX₁ ainsi que de la partie protéique des LOX₂ suggérant que ce récepteur affecte la prise hépatique dans la captation globale des LDL légèrement oxydées.

3.7 Rôle de CD36 dans la clairance plasmatique des LDL fortement oxydées

Les LDL fortement oxydées (FOX) ont été obtenues sensiblement selon la même méthode que celle utilisée pour la préparation des LOX₁, mis à part leur incubation d'une durée de 20 heures en présence de cuivre. Des analyses de clairance plasmatiques ont aussi été effectuées sur une période d'une heure utilisant la stratégie avec bolus chez des souris mâles sauvages et déficientes pour le CD36 (Figure 13).

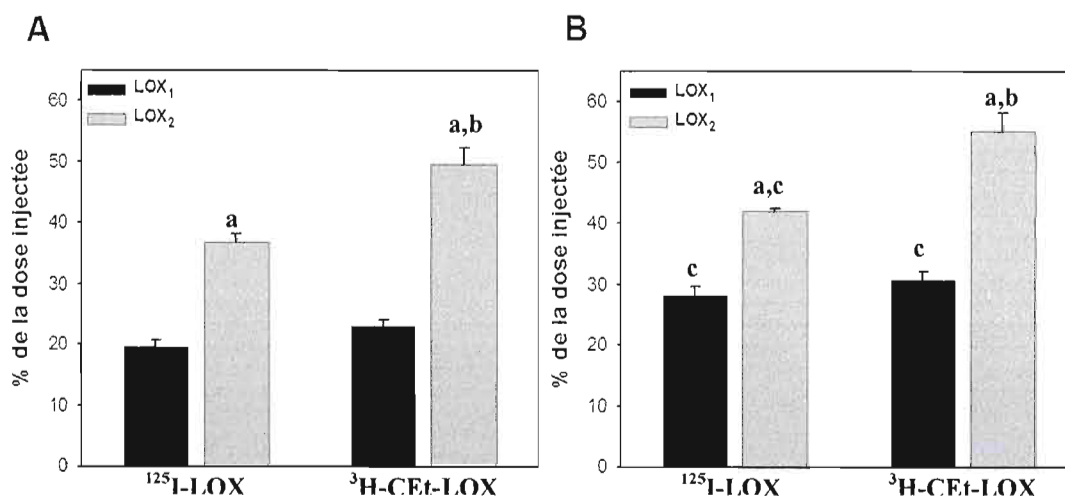


Figure 12 : Contribution hépatique du récepteur CD36 dans le métabolisme des LOX₁ et LOX₂. Cinquante microgrammes de ¹²⁵I-LOX ou de ³H-CET-LOX et un bolus de LOX non marquées de 450 µg ont été administrés à des souris mâles sauvages (A) et déficientes en CD36 (B). Des analyses de clairances plasmatiques ont été réalisées sur une période d'une heure et le foie des animaux a ensuite été récolté. Le contenu en radioactivité de chacun des foies a été analysé comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne ± S.E.M. de trois expériences.

a statistiquement différent ($p < 0,05$) des LOX₁.

b statistiquement différent ($p < 0,05$) des ¹²⁵I-LOX.

c statistiquement différent ($p < 0,05$) des souris sauvages.

La clairance des parties lipidique et protéique des FOX est instantanée chez les souris contrôles lorsque 50 µg de FOX sont injectés sans bolus puisque la totalité de la dose est éliminée avant les deux minutes suivant l'injection (figure 13A). L'addition de 450 µg ou de 1,45 mg de FOX non marquées a pour effet de diminuer la vitesse d'élimination des ¹²⁵I-FOX et diminue davantage celle des ³H-CET-FOX (figures 13B et C). Similairement à ce qu'il a été observé avec les LOX₁, la vitesse de disparition de la partie lipidique des FOX est plus lente que celle de la partie protéique indiquant que la captation sélective n'est pas la principale voie utilisée pour l'élimination des FOX.

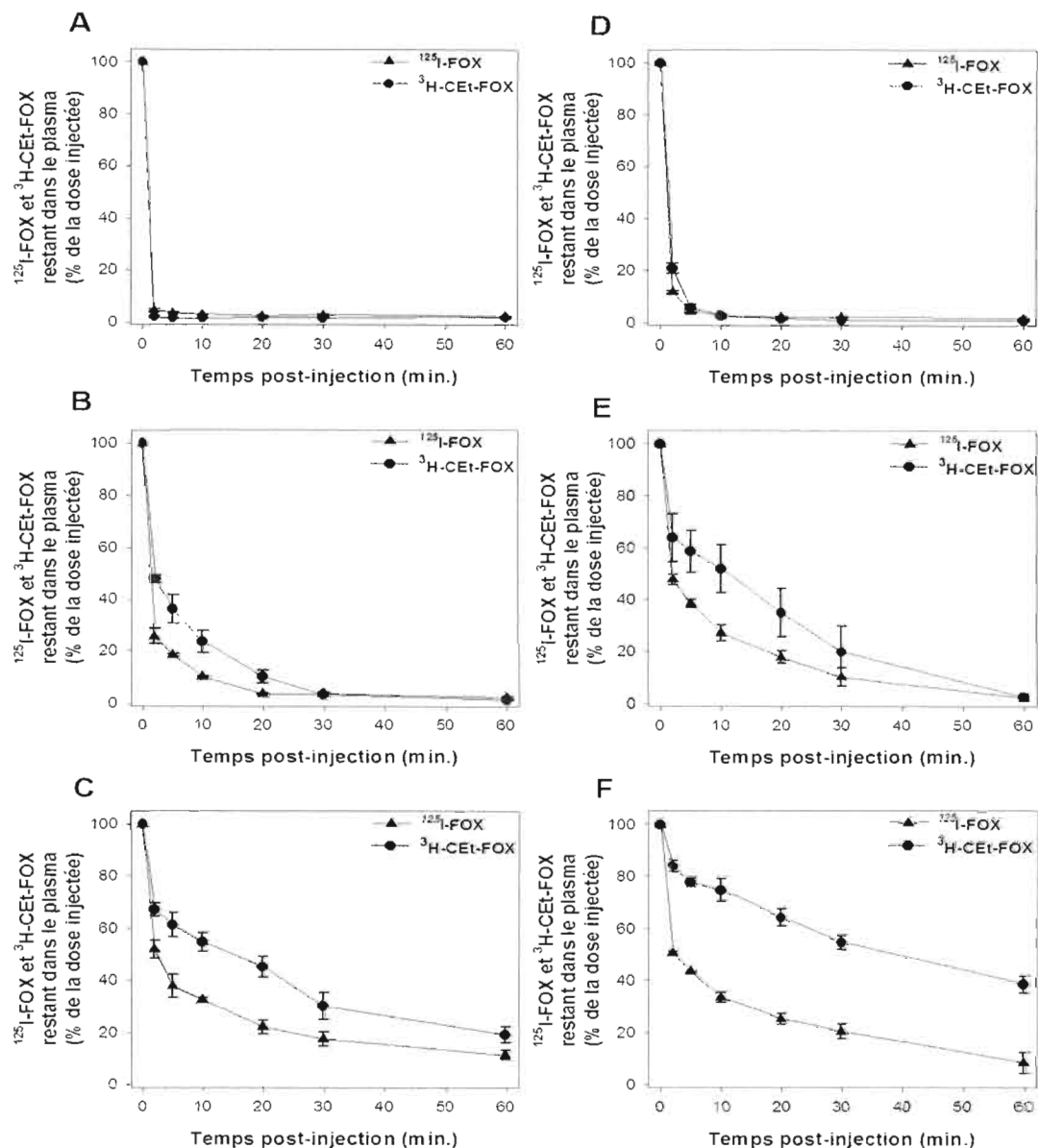


Figure 13 : Clairance plasmatique de ^{125}I -FOX (▲) et ^3H -CET-FOX (●) oxydées après le marquage radioactif et injectées chez des souris mâles sauvages (A, B et C) et déficientes en CD36 (D, E et F) selon différents bolus. Cinquante μg de lipoprotéines marquées sans bolus (A et D), avec un bolus de 450 μg (B et E) ou un bolus de 1,45 mg (C et F) de FOX non marquées ont été injectés aux souris par la veine de la queue et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée selon le procédé décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences.

Dans le cas des souris déficientes en CD36, les parties protéique et lipidique des FOX injectées sans bolus sont métabolisées très rapidement et de façon équivalente (figure 13D). L'ajout d'un bolus de 450 μg réduit la vitesse de clairance de la partie protéique des FOX et diminue d'autant plus celle de la partie lipidique de ces lipoprotéines modifiées (figure 13E). Le ralentissement de l'élimination des ^{125}I -FOX est encore plus remarqué lorsque 1,45 mg de bolus est ajouté à la dose (figure 13F). Par contre, il n'y a pas de différence importante dans la vitesse de disparition des ^3H -CET-FOX lorsque 450 μg ou 1,45 mg de bolus sont additionnés. Ainsi, comme pour les souris sauvages, la voie de captation sélective n'est pas la voie majoritairement empruntée pour la clairance des FOX chez les souris CD36 (-/-).

Globalement, la clairance des parties lipidique et protéique est ralentie pour les souris CD36 (-/-) comparativement à celle des souris contrôles. Ce ralentissement de clairance est légèrement observable dans la situation où 50 μg de FOX sont injectés seuls (figures 13A et D). Cette tendance est cependant plus remarquée lorsqu'un bolus est ajouté à la dose initiale. En effet, la clairance de la partie protéique des FOX est ralentie pour les souris CD36 (-/-) en comparaison avec celle des souris sauvages lorsqu'un bolus de 450 μg est additionné (figures 13B et E), mais l'ajout de 1,45 mg de bolus ne diminue pas davantage cette clairance (figures 13C et F). La situation est différente au niveau de clairance de la partie lipidique car les ^3H -CET-FOX sont plus lentement éliminés chez les souris CD36 (-/-) avec l'ajout de 450 μg de FOX (figure 13E), et l'écart entre les souris contrôles est encore plus considérable avec l'ajout de 1,45 mg de bolus (Figures 13C et F). En somme, l'absence de CD36 a pour effet de ralentir la clairance des parties protéique et lipidique des FOX ce qui suggère l'implication du récepteur dans la voie de la captation globale des FOX.

3.8 Taux catabolique fractionnel des FOX

Les valeurs des TCF calculées pour les FOX présentées dans le tableau VI montrent de façon générale que la partie protéique des FOX est éliminée plus rapidement que la partie lipidique. Ainsi, les données indiquent que ces lipoprotéines ne sont pas métabolisées par la voie de la captation sélective mais plutôt par la voie de la captation globale. De plus, la perte du récepteur CD36 affecte de façon importante la clairance de ces molécules oxydées car un ralentissement de la vitesse de clairance de la partie protéique et de la partie lipidique est observé pour les souris CD36 (-/-). Bref, comme il a été démontré par les courbes de clairances plasmatiques (figure 13), le CD36 contribue à l'élimination des FOX par la voie de la captation globale.

Tableau VI : Taux catabolique fractionnel (TCF) de ^{125}I -FOX et ^3H -Cet-FOX injectées à des souris mâles CD36 (+/+) et déficientes en CD36 (-/-). Cinquante μg de FOX marquées sans bolus, avec un bolus de 450 μg ou un bolus de 1,45 mg ont été injectés et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée et les courbes de clairances plasmatiques ont été tracées. Les TCF ont été calculés comme indiqué dans la section Matériel et Méthodes et sont exprimés en *pools*/min. La captation sélective est démontrée lorsque la valeur de TCF des ^{125}I -LDL, soustraite à la valeur de TCF des ^3H -Cet-LDL, est plus grande que zéro. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences.

		^{125}I -FOX	^3H -Cet-FOX	^3H -Cet-FOX - ^{125}I -FOX
Sans Bolus	+/+	0,404 \pm 0,008	0,387 \pm 0,017	-0,041 \pm 0,001
	-/-	0,330 \pm 0,010 ^{a,c}	0,289 \pm 0,009 ^c	-0,041 \pm 0,001
Bolus 450 μg	+/+	0,336 \pm 0,001 ^a	0,148 \pm 0,018 ^a	-0,188 \pm 0,017 ^a
	-/-	0,107 \pm 0,018 ^c	0,063 \pm 0,014 ^{a,c}	-0,045 \pm 0,013 ^c
Bolus 1,45 mg	+/+	0,062 \pm 0,009 ^{a,b}	0,034 \pm 0,005 ^{a,b}	-0,027 \pm 0,009 ^b
	-/-	0,061 \pm 0,008 ^a	0,016 \pm 0,001 ^{a,b,c}	-0,045 \pm 0,006

Légende: ^a : statistiquement différent ($p < 0,05$) des expériences sans bolus.

^b : statistiquement différent ($p < 0,05$) des expériences avec un bolus de 450 μg .

^c : statistiquement différent ($p < 0,05$) des souris sauvages.

3.9 Contribution hépatique de CD36 dans le métabolisme des LDL fortement oxydées

La contribution hépatique des LDL fortement oxydées a été étudiée afin de vérifier le rôle du foie dans le métabolisme des FOX. Le pourcentage de la dose injectée des ^{125}I -FOX injectées seules retrouvé dans le foie des souris sauvages est de 30 % (figure 14A). Cette valeur augmente significativement à 50 % lorsque les lipoprotéines sont injectées avec un bolus de 450 μg et à 60% avec un bolus de 1,45 mg. La quantité de ^3H -CEt-FOX est de 25 % pour les lipoprotéines marquées injectées seules, et augmente respectivement à 34 % et à 29 % pour les lipoprotéines injectées avec un bolus de 450 μg et de 1,45 mg. Au niveau du foie des souris sauvages, les FOX ne sont pas métabolisées par la voie de la captation sélective car il y a de façon générale, plus de captation de ^{125}I -FOX que de captation de ^3H -CEt-FOX. De même, la captation sélective n'est également pas perçue chez les souris CD36 (-/-) (figure 14B). En effet, la prise hépatique des ^{125}I -FOX est de 50 % pour les lipoprotéines administrées seules, 70 % lorsque les ^{125}I -FOX sont injectées avec un bolus de 450 μg et 53 % avec un bolus de 1,45 mg comparativement à 45 % pour les ^3H -CEt-FOX injectées seules, 41 % avec un bolus de 450 μg et 27 % avec un bolus de 1,45 mg. Chez les souris déficientes en CD36, mis à part les injections de 500 μg , la quantité de FOX est généralement plus élevée que chez les souris sauvages. Ces résultats indiquent que le CD36 hépatique n'est pas le récepteur majoritairement impliqué dans la prise des FOX au niveau du foie, et ils suggèrent même que l'absence de ce récepteur favorise un ou d'autres récepteur(s) *scavenger* hépatiques. Les analyses de clairance indiquaient toutefois que le CD36 est impliqué dans le catabolisme des FOX, et les présentes données suggèrent que ce soit le CD36 situé à des sites extra-hépatiques qui soit responsable de ce processus.

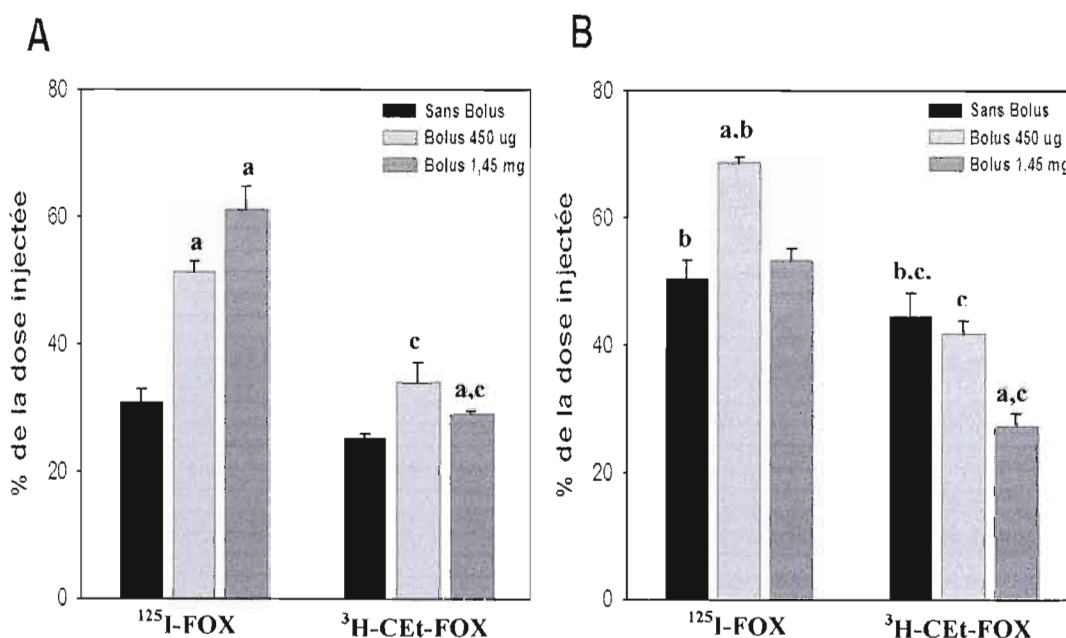


Figure 14 : Contribution hépatique du récepteur CD36 dans le métabolisme des LDL fortement oxydées. Cinquante microgrammes de ^{125}I -FOX ou de ^3H -CET-FOX injectées seules, avec un bolus de FOX non marquées de 450 μg ou un bolus de 1,45 mg ont été administrés à des souris mâles sauvages (A) et déficientes en CD36 (B). Des analyses de clairances plasmatiques ont été réalisées sur une période d'une heure et le foie des animaux a ensuite été récolté. Le contenu en radioactivité de chacun des foies a été analysé comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences.

a statistiquement différent ($p < 0,05$) des FOX injectées seules.

b statistiquement différent ($p < 0,05$) des souris sauvages.

c étant statistiquement différent ($p < 0,05$) de la valeur en ^{125}I .

3.10 Impact des méthodes de marquage radioactif et d'oxydation des FOX sur leur clairance plasmatique

Puisque la procédure de marquage radioactif et d'oxydation a montré une différence sur le métabolisme des LOX, nous avons donc vérifié si la méthode de préparation avait également une incidence sur le métabolisme des FOX. Ainsi, des FOX₂ ont été préparées de la même façon que les LOX₂ et des analyses de clairances plasmatiques ont été effectuées (figure 15).

Au niveau de la clairance de la partie protéique des FOX₂ chez les souris sauvages, leur élimination est instantanée quand ces lipoprotéines sont injectées seules (figure 15A). Leur vitesse de clairance ralentie lors de l'ajout d'un bolus de 450 µg et le retard est encore plus observable lorsque 1,45 mg de bolus est ajouté à la dose (figures 15B et C). La situation est cependant différente pour la clairance de la partie lipidique des FOX₂ lorsqu'elles sont injectées seules. En effet, la dose disparaît totalement du plasma sanguin 2 minutes après l'injection, réapparaît de façon croissante à partir de ce temps pour ensuite former un plateau à 30 % à partir des 20 minutes post-injection. Toutefois, ce profil de la clairance des ³H-CET-FOX₂ n'est pas observé lorsque la dose injectée de ces lipoprotéines est augmentée (figures 15B et C). Leur clairance est par contre ralentie si l'on compare avec leur clairance lorsqu'elles sont injectées sans bolus.

Chez les souris CD36 (-/-), la clairance de la partie protéique des FOX₂ est rapide quand ces lipoprotéines sont injectées sans bolus (figure 15D), mais leur vitesse de clairance diminue graduellement selon l'addition de bolus (figures 15E et F). Lorsque les ³H-CET-FOX₂ sont administrées seules, 60 % de la dose injectée est éliminée deux minutes après l'injection et cette quantité résiduelle contenue dans le plasma reste constante jusqu'à la fin de l'analyse (figure 15D). Avec l'ajout d'un bolus de 450 µg, la vitesse de clairance des ³H-CET-FOX₂ diminue de façon régulière et progressive pour être pratiquement totalement éliminée au terme de l'analyse (figure 15E). L'addition d'une plus grande quantité de bolus a pour effet de ralentir davantage la vitesse de clairance de ces lipoprotéines (figure 15F). Dans le même cas que pour les FOX, les FOX₂ ne sont pas principalement métabolisées par la voie de la captation sélective puisque la partie lipidique des FOX₂ est éliminée beaucoup moins rapidement que la partie protéique de ces lipoprotéines, autant chez les souris CD36 (+/+) que celles CD36 (-/-). Par contre, l'absence de CD36 ralentit légèrement la clairance des ¹²⁵I-FOX₂ et diminue considérablement la clairance des ³H-CET-FOX₂, ce qui indique un rôle de ce récepteur dans la captation globale des FOX₂.

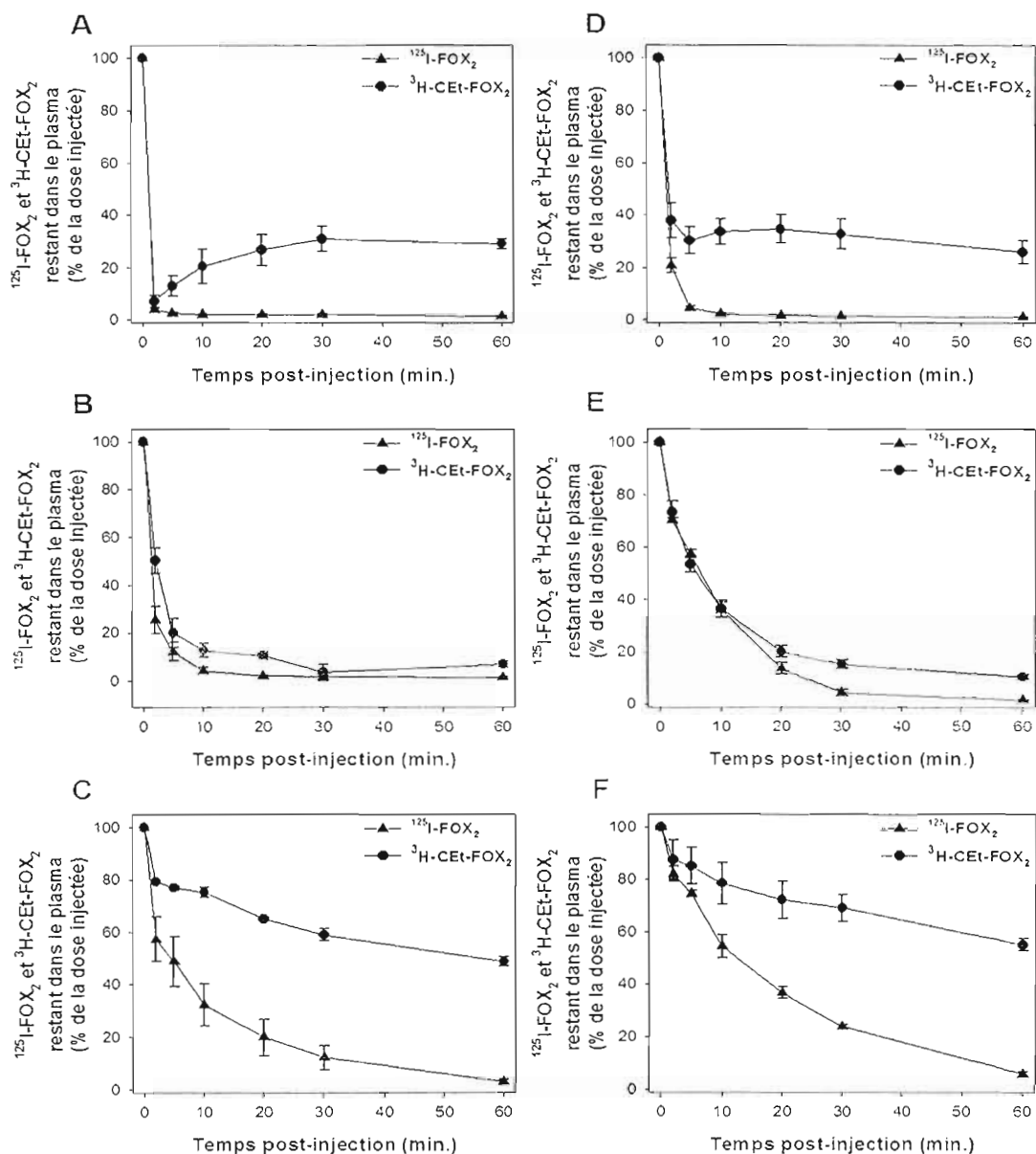


Figure 15 : Clairance plasmatique de $^{125}\text{I-FOX}_2$ (\blacktriangle) et $^3\text{H-CET-FOX}_2$ (\bullet) oxydées avant le marquage radioactif et injectées chez des souris mâles sauvages (A, B et C) et déficientes en CD36 (D, E et F) selon différents bolus. Cinquante μg de lipoprotéines marquées sans bolus (A et D), avec un bolus de 450 μg (B et E) ou un bolus de 1,45 mg (C et F) de FOX_2 non marquées ont été injectés aux souris par la veine de la queue et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée selon la méthode décrite dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences.

3.11 Taux catabolique fractionnel des FOX₂

Les TCF des ¹²⁵I-FOX₂ injectées sans bolus et avec un bolus de 450 µg sont semblables pour les souris sauvages, c'est-à-dire très rapide comparativement au TCF de ces lipoprotéines injectées avec un bolus de 1,45 mg (tableau VII). Pour les souris déficientes pour le gène CD36, le TCF de la partie protéique des FOX₂ est aussi élevé, mais sa valeur diminue progressivement suivant la quantité de bolus injectée, indiquant que la clairance ralentie tel qu'observée dans les courbes de clairance (figure 15). Due à la forme irrégulière des courbes de clairance des ³H-CEt-FOX₂ injectées sans bolus, leur TCF n'a pu être calculé. Le TCF des ³H-CEt-FOX₂ injectées avec des bolus a toutefois été calculable et les valeurs diminuent en fonction de la quantité de FOX₂ injectées. Pour les deux génotypes, les TCF des ³H-CEt-FOX₂ sont plus petits que ceux des ¹²⁵I-FOX₂, signifiant une absence de captation sélective qui se traduit par des valeurs négatives calculées pour ce phénomène. Ainsi, les valeurs de TCF corrélaient avec les courbes de clairances plasmatiques qui démontraient que les FOX₂ sont métabolisées par la voie de la captation globale plutôt que par la voie de la captation sélective. De plus, le ralentissement de clairance observé chez les souris CD36 (-/-) indique un rôle de CD36 dans la voie de la captation globale des FOX₂.

3.12 Contribution hépatique de CD36 dans le métabolisme des FOX₁ et des FOX₂

Dans la section traitant du métabolisme des LOX, nous avons pu observer que ces lipoprotéines étaient métabolisées différemment par le foie selon leur mode de préparation. Dans la présente section, nous avons étudié le métabolisme des FOX₂ au niveau hépatique et nous avons aussi vérifié l'impact de la procédure de marquage et d'oxydation en comparant le métabolisme hépatique des FOX₁ et des FOX₂ (figure 16). Au niveau du foie des souris sauvages, la partie protéique des FOX₁ marquée à l'¹²⁵I est davantage captée que celle des FOX₂. Par contre, la partie lipidique des

FOX₁ marquée au ³H-CET est diminuée de 40% par rapport à celle des FOX₂. En comparant la quantité de ¹²⁵I-FOX et la quantité de ³H-CET-FOX pour les deux différents types de FOX, on s'aperçoit que les FOX₂ sont métabolisées par le foie en partie selon la voie de la captation sélective tandis que les FOX₁ sont soumises à la voie de la captation globale. La situation est semblable au niveau hépatique pour les souris CD36 (-/-) puisqu'on retrouve 35% plus de ¹²⁵I-FOX₁ que de ¹²⁵I-FOX₂ dans le foie et 30% moins de ³H-CET-FOX₁ que de ³H-CET-FOX₂. Comme dans le cas des souris sauvages, de la captation globale est perçue pour les FOX₁, et de la captation sélective pour les FOX₂. La captation sélective perçue au niveau hépatique pour les FOX₂ est en contradiction avec les analyses de clairances plasmatiques et pourrait s'expliquer par une plus grande captation globale des FOX₂ à des sites extra-hépatiques.

Tableau VII : Taux catabolique fractionnel (TCF) de ¹²⁵I-FOX₂ et ³H-CET-FOX₂ injectées à des souris mâles CD36 (+/+) et déficientes en CD36 (-/-). Cinquante µg de FOX₂ marquées sans bolus, avec un bolus de 450 µg ou un bolus de 1,45 mg ont été injectées et 50 µl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée et les courbes de clairances plasmatiques ont été tracées. Les TCF ont été calculés comme indiqué dans la section Matériel et Méthodes et sont exprimés en pools/min. La captation sélective est démontrée lorsque la valeur de TCF des ¹²⁵I-LDL, soustraite à la valeur de TCF des ³H-Cet-LDL, est plus grande que zéro. Les valeurs représentées sont la moyenne ± S.E.M. de trois expériences.

		¹²⁵ I-FOX ₂	³ H-CET-FOX ₂	³ H-CET-FOX ₂ - ¹²⁵ I-FOX ₂
Sans Bolus	+/+	0,534 ± 0,064	N/D	N/D
	-/-	0,410 ± 0,026	N/D	N/D
Bolus 450 µg	+/+	0,536 ± 0,032	0,081 ± 0,015	-0,455 ± 0,017
	-/-	0,104 ± 0,008 ^{a,c}	0,052 ± 0,007	-0,051 ± 0,001 ^c
Bolus 1,45 mg	+/+	0,072 ± 0,004 ^{a,b}	0,011 ± 0,001 ^b	-0,061 ± 0,003 ^b
	-/-	0,050 ± 0,002 ^{a,b,c}	0,008 ± 0,001 ^{b,c}	-0,042 ± 0,002 ^{b,c}

Légende: ^a : statistiquement différent (p<0,05) des expériences sans bolus.

^b : statistiquement différent (p<0,05) des expériences avec un bolus de 450 µg.

^c : statistiquement différent (p<0,05) des souris sauvages.

N/D : Valeur non disponible.

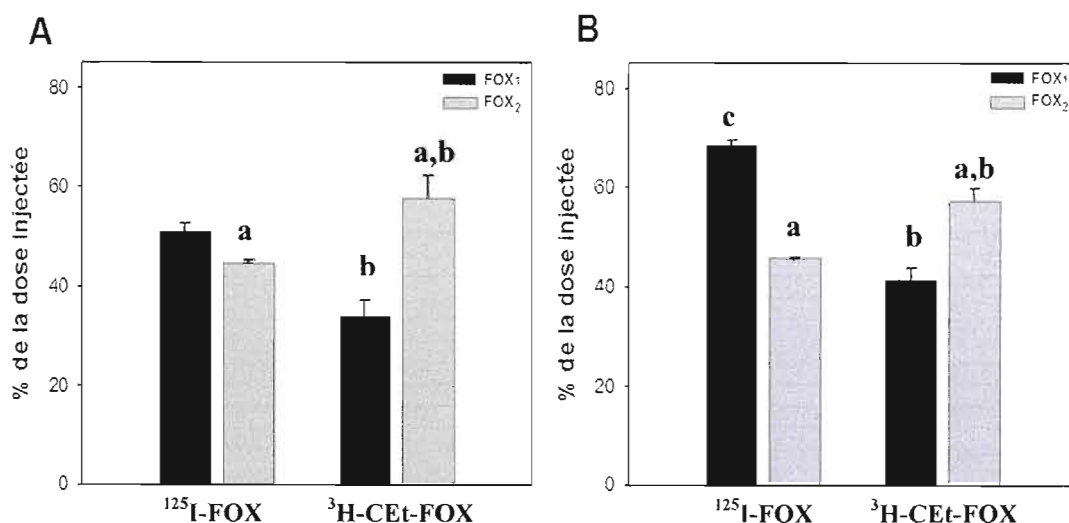


Figure 16 : Contribution hépatique du récepteur CD36 dans le métabolisme des FOX₁ et des FOX₂. Cinquante microgrammes de ¹²⁵I-FOX ou de ³H-CET-FOX et un bolus de 450 µg de FOX non marquées ont été administrés à des souris sauvages (A) et déficientes en CD36 (B). Des analyses de clairances plasmatiques ont été réalisées sur une période d'une heure et le foie des animaux a ensuite été récolté. Le contenu en radioactivité de chacun des foies a été analysé comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne ± S.E.M. de trois expériences.

a statistiquement différent ($p < 0,05$) des FOX₁.

b statistiquement différent ($p < 0,05$) des ¹²⁵I-FOX.

c statistiquement différent ($p < 0,05$) des souris sauvages.

3.13 Propriétés chimiques des lipoprotéines étudiées

Étant donné que des différences ont été observées entre la clairance plasmatique des LOX₁ et les LOX₂, et entre celle des FOX₁ et des FOX₂, nous avons tenté de déterminer ce qui pouvait causer ces distinctions dans le profil de clairance. Le mode de préparation des lipoprotéines étant la principale dissemblance entre les différentes LOX et entre les différentes FOX, nous avons comparé leur degré d'oxydation. La figure 17 montre la migration relative des lipoprotéines à l'étude sur un gel agarose/barbital. La migration des LOX₂, FOX₂, LOX₁ et FOX₁ est respectivement de 1,4, 1,7, 1,5 et 1,6 fois celle des LDL natives. Tel qu'attendu, les FOX sont en

général plus oxydées que leurs LOX correspondantes. Cependant, si les LOX et les FOX sont comparées entre elles, on s'aperçoit que les LOX₁ sont plus oxydées que les LOX₂, et que les FOX₁ sont plutôt moins oxydées que les FOX₂. Puisque les LOX₁ ont une migration relative se rapprochant plus des FOX, il serait possible que ces LOX₁ soient, étant donné leur procédure de marquage, très proches d'être des FOX.

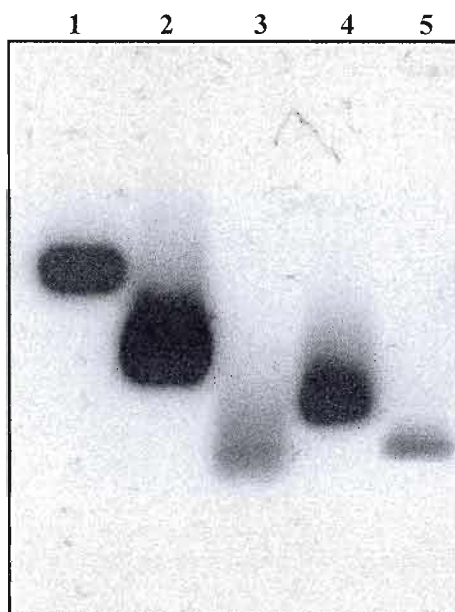


Figure 17 : Autoradiographie de la migration relative des LDL natives, LOX₁, FOX₁, LOX₂ et FOX₂ sur gel agarose/barbital. Vingt milles cpm de ¹²⁵I-LDL (1), de ¹²⁵I-LOX₂ (2), de ¹²⁵I-FOX₂ (3), ¹²⁵I-LOX₁ (4) et de ¹²⁵I-FOX₁ (5) ont été déposés sur gel agarose/barbital. Le gel a ensuite été solidifié, séché comme mentionné dans la section Matériel et Méthodes et exposé sur un film Kodak durant 16 heures à – 80°C.

3.14 Implication de SR-BI dans la clairance des LDL légèrement oxydées.

La contribution du récepteur SR-BI dans le métabolisme *in vivo* des LDL oxydées a aussi été investiguée dans ce projet car des études *in vitro* précédentes ont démontré que le SR-BI est un récepteur pour les LDL oxydées (Gillotte-Taylor *et al.* 2001). De plus, des données récentes de notre laboratoire ont indiqué que le SR-BI ne serait pas

impliqué dans le métabolisme des LOX (Bourret *et al.* 2006). Étant donné que les données de Bourret *et al.* (2006) ont été générées à partir de LDL oxydées de la même façon que les LOX₁, nous avons choisi ici d'évaluer le rôle de SR-BI dans la clairance de LOX₂. Contrairement à la méthode d'injection utilisée par Bourret et collaborateurs (2006), les analyses de clairances plasmatiques entreprises dans ce projet ont été réalisées avec la stratégie de bolus, et les injections ont été effectuées par la veine de la queue chez des souris non anesthésiées.

Les vitesses de clairance des parties lipidique et protéique des LOX₂ sont, chez les souris sauvages, très rapides et aucune différence notable n'est observable entre les ³H-CEt-LOX₂ et les ¹²⁵I-LOX₂ (figure 18A). L'élimination des ³H-CEt-LOX₂ ralentit progressivement suivant l'ajout de bolus, mais ce ralentissement occasionné par une plus grande quantité de lipoprotéines injectées est plus considérable pour les ¹²⁵I-LOX₂ (figures 18B et C). Du côté des souris SR-BI (-/-), le profil de clairance des ³H-CEt-LOX₂ et des ¹²⁵I-LOX₂ injectées seules est semblable à celui des souris sauvages, i.e. très rapide. L'ajout de bolus dans la dose administrée a aussi pour effet de réduire la vitesse de clairance des ³H-CEt-LOX₂ et des ¹²⁵I-LOX₂ (figures 18E et F). Toutefois, une légère diminution dans la vitesse de clairance des ¹²⁵I-LOX₂ injectée avec un bolus de 1,45 mg est remarquée pour les souris SR-BI (-/-) comparativement aux souris sauvages. En somme, ces données indiquent la présence de la captation sélective provenant des LOX₂ et ce, chez les souris sauvages et déficientes en SR-BI. Par contre, aucune différence notable n'est observée entre les deux génotypes ce qui confirme les résultats obtenus de Bourret *et al.* (2006) qui montraient une absence de contribution de SR-BI dans l'élimination de LOX₁ par la voie de la captation sélective.

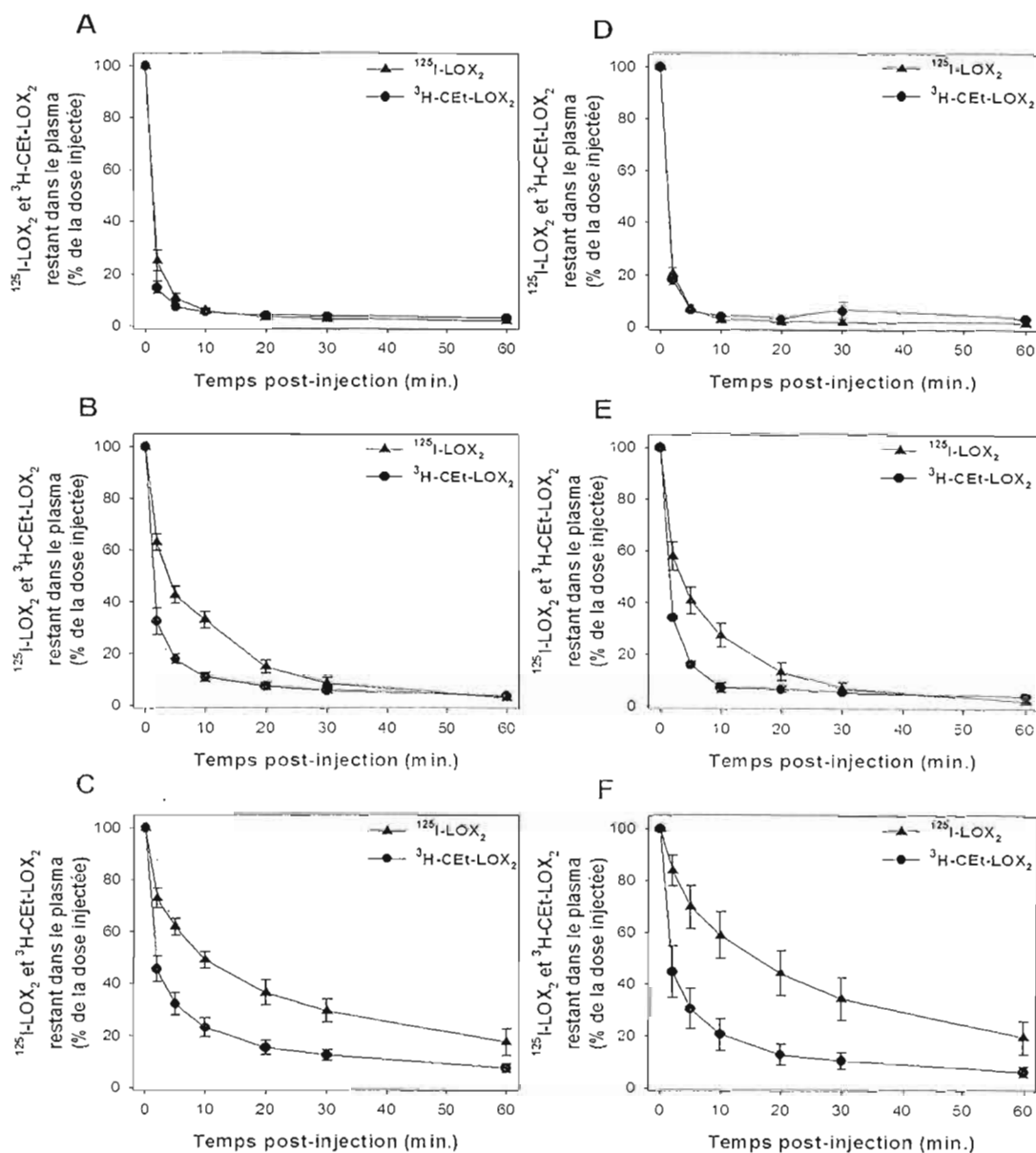


Figure 18 : Clairance plasmatique de ^{125}I -LOX₂ (▲) et ^3H -CET-LOX₂ (●) oxydées avant le marquage et injectées chez des souris mâles sauvages (A, B et C) et déficientes en SR-BI (D, E et F) selon différents bolus. Cinquante μg de lipoprotéines marquées sans bolus (A et D), avec un bolus de 450 μg (B et E) ou un bolus de 1,45 mg (C et F) de LOX₂ non marquées ont été injectés aux souris par la veine de la queue et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée selon la procédure décrite dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne ± S.E.M. de trois expériences.

3.15 Taux catabolique fractionnel des LOX₂ métabolisées chez les souris sauvages et déficientes en SR-BI.

La vitesse de clairance des ¹²⁵I-LOX₂ diminue selon la quantité de lipoprotéines injectées pour les souris sauvages car le TCF des ¹²⁵I-LOX₂ injectées avec un bolus de 450 µg est deux fois moins élevé que les ¹²⁵I-LOX₂ injectées sans bolus (tableau VIII). Le ralentissement est encore plus prononcé dans le cas d'une injection substantielle de lipoprotéines (bolus de 1,45 mg) car le TCF est, dans ce cas, 8 fois moins élevé. Une plus grande quantité de lipoprotéines injectées ralentie également la vitesse de clairance des ³H-CET-LOX₂ mais de façon moins importante que dans le cas des ¹²⁵I-LOX₂.

Pour les souris SR-BI (-/-), les TCF de la partie protéique et de la partie lipidique des LOX₂ diminuent aussi selon la dose injectée de lipoprotéines et les diminutions sont plus considérables que ceux calculés pour les souris sauvages. Pour les deux génotypes, la vitesse de clairance de la partie lipidique est plus importante que la vitesse de clairance de la partie protéique signifiant que les LOX₂ sont métabolisées par la voie de la captation sélective chez ces souris. Ce phénomène tend à augmenter suivant la quantité de LOX₂ injectées, mais le SR-BI ne semble pas affecter la prise sélective des EC des LOX₂. Ces résultats sont en accord avec les analyses de clairance et appuient les résultats de Bourret *et al.* (2006) qui montraient que le récepteur SR-BI n'est pas impliqué dans la captation sélective des LDL légèrement oxydées.

Tableau VIII : Taux catabolique fractionnel (TCF) de $^{125}\text{I-LOX}_2$ et $^3\text{H-CET-LOX}_2$ injectées à des souris mâles SR-BI (+/+) et déficientes en SR-BI (-/-). Cinquante μg de lipoprotéines marquées sans bolus, avec un bolus de 450 μg ou un bolus de 1,45 mg de LOX_2 non marquées ont été injectés et 50 μl d'échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période d'une heure. La mesure de la radioactivité restante dans le plasma a été analysée et les courbes de clairances plasmatiques ont été tracées. Les TCF ont été calculés comme stipulé dans la section Matériel et Méthodes et sont exprimés en *pools*/min. La captation sélective est démontrée lorsque la valeur de TCF des $^{125}\text{I-LDL}$, soustraite à la valeur de TCF des $^3\text{H-Cet-LDL}$, est plus grande que zéro. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences.

		$^{125}\text{I-LOX}_2$	$^3\text{H-CET-LOX}_2$	$^3\text{H-CET-LOX}_2 - ^{125}\text{I-LOX}_2$
Sans Bolus	+/+	0,419 \pm 0,001	0,432 \pm 0,006	0,013 \pm 0,005
	-/-	0,355 \pm 0,008 ^c	0,375 \pm 0,017 ^c	0,020 \pm 0,014
Bolus 450 μg	+/+	0,211 \pm 0,002 ^a	0,252 \pm 0,014 ^a	0,041 \pm 0,012
	-/-	0,111 \pm 0,012 ^{a,c}	0,158 \pm 0,014 ^{a,b}	0,046 \pm 0,002
Bolus 1,45 mg	+/+	0,049 \pm 0,005 ^{a,b}	0,113 \pm 0,009 ^{a,b}	0,064 \pm 0,005 ^a
	-/-	0,025 \pm 0,002 ^{a,b,c}	0,085 \pm 0,005 ^{a,b,c}	0,060 \pm 0,003 ^{a,b}

Légende: ^a : statistiquement différent ($p < 0,05$) des expériences sans bolus.

^b : statistiquement différent ($p < 0,05$) des expériences avec un bolus de 450 μg .

^c : statistiquement différent ($p < 0,05$) des souris sauvages.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Des études épidémiologiques ont montré une corrélation positive entre le niveau élevé de LDL plasmatiques et l'incidence sur le développement de l'athérosclérose (Brown et Goldstein 1979). En concentrations élevées, les LDL persistent plus longtemps dans le courant sanguin et sont ainsi plus susceptibles à des modifications oxydatives qui peuvent affecter autant leur partie lipidique que protéique (Steinbrecher 1987). Le rôle des LDLox dans l'athérosclérose fait l'objet de recherches depuis maintes années et quelques progrès ont été réalisés. Plusieurs évidences montrent l'implication des LDL oxydées dans les stades précoces de l'athérosclérose. Ainsi, la présence de LDL oxydées a été démontrée dans les lésions athéromateuses (Ylä-Herttuala *et al.* 1989) et des anticorps dirigés contre les LDL oxydées, dont les titres sont en accord avec la progression des lésions athérosclérotiques, ont été identifiés dans la circulation sanguine (Palinski *et al.* 1989). Malgré ces connaissances, l'importance physiologique des LDL oxydées circulantes est encore mal connue. Bien que ces molécules oxydées soient peu nombreuses dans le plasma sanguin, leur présence a récemment été confirmée (Toshima *et al.* 2000). La présence en faible concentration des LDL oxydées pourrait s'expliquer par le fait que ces composés oxydés sont rapidement métabolisés. Des études ont déjà été réalisées sur le métabolisme des LDL oxydées, et le foie serait le principal organe impliqué dans la clairance de ces lipoprotéines (Ling *et al.* 1997). Toutefois, le ou les récepteur(s) hépatique(s) en cause n'a(ont) pas encore été identifié(s).

Effet de l'oxydation sur les propriétés chimiques et la clairance plasmatique des LDL natives.

L'oxydation amène des changements chimiques importants au sein des LDL, notamment en altérant la composition chimique des chaînes d'acide gras qui forment des aldéhydes hautement réactifs neutralisant la charge positive des résidus lysines de l'apoB-100 pour ainsi conférer une charge plus négative aux LDL (Steinbrecher 1987). Cette modulation de la charge des LDL oxydées occasionne une migration électrophorétique relative plus grande (figure 5). Comme l'ont observé Zeng et collaborateur (2002), les présents résultats montrent que la migration relative des LDL oxydées est en fonction de leur période d'exposition au sulfate de cuivre, et confirment que nos préparations de LDL ont été oxydées à différents degrés.

L'oxydation a pour effet d'accentuer la vitesse de clairance des LDL natives car une légère oxydation augmente la vitesse d'élimination de la partie protéique des LDL marquées à l'¹²⁵I, et une oxydation plus importante occasionne une disparition encore plus rapide de ces lipoprotéines (figure 6). Ces observations sont en accord avec les résultats de clairance plasmatique de LDL oxydées observés chez le rat par van Berkel et collaborateurs (1991). L'élimination rapide des LDL oxydées de la circulation sanguine indique qu'un ou plusieurs récepteur(s) est (sont) impliqué(s) dans cette disparition. Plusieurs candidats ont été proposés, tels que les SR-A, le SR-BI, le *Lectin-like receptor for ox-LDL-1* (LOX-1) ainsi que le CD36. Le récepteur CD36 est un récepteur potentiel pour la captation des LDL oxydées car des études *in vitro* ont montré que ce récepteur contribue à la liaison et à la dégradation de ces composés oxydés (Febbraio *et al.* 1999) (Nicholson *et al.* 2000).

Effet de l'oxydation sur le métabolisme *in vivo* des LDL natives

Dans le but de vérifier quel effet l'oxydation des LDL natives pouvait avoir sur leur métabolisme, nous avons d'abord étudié le métabolisme des LDL natives chez des souris contrôles. Pour les souris femelles et mâles, les figures 7A et C, ainsi que les données du tableau III montrent que les LDL natives sont métabolisées par la voie de la captation sélective puisque la vitesse de la clairance plasmatique de la partie lipidique des LDL natives est accélérée comparativement à la vitesse de clairance plasmatique de la partie protéique de ces lipoprotéines. Ces résultats corroborent les données antérieures de notre équipe qui démontraient par des expérimentations *in vitro* (Rhains *et al.* 2003) et *in vivo* (Brodeur *et al.* 2005) qu'il y a de la captation sélective provenant des LDL. Au niveau tissulaire, nos présents résultats ainsi que d'autres études (Pittman *et al.* 1982) (Carew *et al.* 1982) indiquent que le foie est l'organe majoritairement impliqué dans le catabolisme des LDL natives. Nos résultats indiquent cependant une plus faible proportion des LDL se retrouvant dans le foie que celle rapportée par ces études. Il est à noter que ces études reposent sur des expérimentations effectuées chez le lapin et le rat respectivement, et que leur méthode de marquage de la portion protéique des LDL au [¹⁴C] diffère de la nôtre. Selon la littérature, l'implication prédominante du foie dans l'élimination des lipoprotéines de faible densité est effectuée en grande partie par le rLDL. Selon Dietschy et collaborateurs (1993), le rLDL serait responsable de seulement 75% de l'élimination des LDL, ce qui laisse entrevoir l'implication d'autre(s) récepteur(s) ou voie(s) dans le métabolisme des LDL. Nos données présentées à la figure 8 montrent effectivement que la voie de la captation sélective est une voie utilisée par le foie pour métaboliser les LDL natives.

Contrairement à ce qu'il a été observé au niveau du métabolisme des LDL natives, les LDL légèrement oxydées (LOX) ne seraient pas principalement métabolisées selon la voie de la captation sélective. En effet, lorsque nous avons injecté 50 µg de LOX₁

marquées en leur portion lipidique au ^3H -CEt ou marquées en leur portion protéique à l' ^{125}I , ces lipoprotéines étaient métabolisées presque instantanément. L'élimination de la partie protéique était par contre plus rapide que celle de la partie lipidique montrant que ces lipoprotéines sont captées par la voie de la captation globale (figure 9A). Afin de s'assurer de l'effet observé, la dose de lipoprotéines injectées a été augmentée dans le but de ralentir cette clairance. Ainsi, lorsque la dose injectée de LOX_1 est décuplée ou même davantage (figures 9B et C), la clairance de la partie protéique reste pratiquement instantanée. Ceci indique que le ou les récepteur(s) impliqué(s) dans l'élimination des LOX_1 par la voie de la captation globale n'est ou ne sont pas saturé(s) par la quantité de lipoprotéines injectées et ce, même dans le cas d'une injection substantielle de LOX_1 . La clairance de la partie lipidique des LOX_1 est toutefois ralentie par l'ajout de bolus, mais la raison de ce phénomène, différent de la disparition protéique, nous échappe. De façon identique à ce qu'il a été retrouvé pour les LDL natives, le foie est un organe impliqué dans le catabolisme des LOX_1 (figure 10A). Son implication évaluée à environ 20% dans cette étude est en corrélation avec les travaux effectués par l'équipe de van Berkel (1991) chez le rat, puisque ce groupe a montré que près de 25 % de la dose injectée de LDL oxydées durant 3 et 6 heures en présence de sulfate de cuivre se retrouvent dans le foie après une période de 60 minutes (van Berkel *et al.* 1991). Les présents résultats ne montrent cependant pas de différence significative entre la proportion de ^{125}I -LDL- LOX_1 et de ^3H -CEt- LOX_1 se retrouvant dans le foie (figure 10A) signifiant que cet organe métabolise les LOX_1 par la voie de la captation globale. En somme, les LOX_1 seraient principalement métabolisées par la voie de la captation globale dans laquelle le foie est impliqué.

Dans le même cas que pour les LOX, les LDL fortement oxydées (FOX) sont, selon nos résultats de la figure 13 et du tableau VI, éliminées par la voie de la captation globale car on retrouve également dans cette situation une clairance moins rapide de la partie lipidique des FOX_1 comparativement à la vitesse d'élimination de la partie protéique. Comme l'ont démontré van Berkel et collaborateurs (1991), ces

lipoprotéines sont métabolisées presque immédiatement après l'injection (figure 13A) indiquant que l'organisme présente un ou des récepteur(s) ayant la capacité de prendre rapidement ces composés oxydés. Cette habileté à éliminer rapidement les FOX₁ de la circulation sanguine est cependant limitée puisqu'une addition de FOX₁ dans la dose injectée ralentie nettement cette clairance et ce, tant au niveau de la captation protéique que dans la captation des EC (figures 13B et C). Le foie est aussi l'organe contribuant fortement à cette élimination. Dans le cas où peu de FOX₁ sont administrées (50 µg), la proportion de ces lipoprotéines marquées dans leur partie lipidique est retrouvée dans le foie de façon équivalente à la portion de FOX₁ marquées à leur partie protéique. Ceci est en accord avec les résultats de nos analyses de clairance plasmatique qui montraient que ces lipoprotéines subissent de la captation globale. Étonnamment, la quantité de FOX₁ marquées au niveau protéique se retrouvant dans le foie est plus importante que la proportion de FOX₁ marquées au niveau lipidique lorsque 500 µg ou 1,45 mg de FOX₁ sont administrés (figure 14A). Ce constat dépasse la théorie de la captation globale par le foie et suggère que le métabolisme des FOX₁ se fasse aussi au niveau extra-hépatique.

Implication du récepteur CD36 dans le métabolisme *in vivo* des LDL natives et oxydées

La cinétique d'élimination des LDL natives n'est pas différente pour les souris déficientes en CD36 comparativement à celle observée pour les souris sauvages (figure 7). Le tableau III montre effectivement que les LDL natives subissent de la captation sélective chez les CD36 (-/-). Par contre, il n'y a aucune différence notable entre les deux génotypes, ce qui indique que le CD36 ne contribue pas au catabolisme des LDL pour cette voie de prise sélective. Cependant, l'absence du récepteur CD36 accélère la vitesse d'élimination de la partie protéique des LDL et montre que ce récepteur a un effet négatif dans la captation globale des LDL. Étant donné que le rLDL est le récepteur le plus reconnu pour faire la dégradation des LDL, on serait

tenté de penser que le CD36, lorsqu'il est présent, nuit à l'habileté du rLDL à faire la captation globale des LDL. Cependant, si on se fit aux connaissances émanant de cellules non hépatiques, ce scénario serait peu envisageable puisque ces deux récepteurs ne sont pas colocalisés au niveau membranaire. En effet, le rLDL est situé dans des invaginations membranaires riches en clathrines et le CD36 est plutôt localisé dans des domaines membranaires ne contenant pas de clathrine, les radeaux lipidiques et les cavéoles (Babitt *et al.* 1997). Toutefois, avant de conclure à ce sujet, des expérimentations devront être menées pour déterminer la localisation de CD36 et du rLDL dans la cellule hépatique. Des analyses par microscopie confocale ou par immunoprécipitation pourraient permettre d'élucider cette hypothèse. Alternativement, un ou d'autres récepteur(s) colocalisé(s) avec le CD36 et ayant la capacité de dégrader les LDL pourrait être affecté(s) par la présence du CD36 dans son habileté à faire la captation globale des LDL puisqu'une étude a montré que 25 % de la prise des LDL pouvait être attribué à un (des) récepteur(s) autre(s) que le rLDL (Dietschy *et al.* 1993). Le récepteur SR-BI n'est pas un candidat probable car les données de notre groupe ont clairement indiqué que ce récepteur n'est pas très impliqué dans cette voie de captation des LDL (Brodeur *et al.* 2005). Au niveau tissulaire, le foie est également l'organe majoritairement responsable de la captation sélective des LDL natives chez les souris CD36 (-/-) (figure 8B). Les résultats montrent par contre que le CD36 a peu d'effet quant à cette prise sélective des LDL par le foie, et soutiennent les résultats de clairances plasmatiques qui indiquaient que ce récepteur n'est pas responsable de la prise sélective des EC provenant des LDL.

D'autre part, les résultats montrent que les LOX₁ sont métabolisées par la voie de la captation globale dans laquelle le CD36 contribue car on note un ralentissement de cette voie d'élimination lorsque ce récepteur est absent. La présence de ce récepteur n'est par contre pas essentielle à la dégradation des LOX₁ car ces lipoprotéines sont tout de même éliminées en son absence. Il existe donc au moins une autre voie d'élimination des LOX₁ qui est indépendante de CD36. Cette voie n'implique

cependant pas les récepteurs SR-AI/II car l'équipe de Steinbrecher a rapporté une absence de contribution de ces récepteurs par des analyses de clairances plasmatiques utilisant des souris déficientes pour les SR-AI/II (Ling *et al.* 1997). Les données récentes de notre groupe excluent également le rôle du récepteur SR-BI dans le catabolisme des LOX₁ (Bourret *et al.* 2006). Le LOX-1, à ne pas confondre avec LOX₁, est un récepteur *scavenger* de classe E, fortement exprimé par les cellules endothéliales vasculaires (Sawamura *et al.* 1997) (Mehta et Li 1998), est aussi un récepteur proposé pour le métabolisme des LOX₁. Le LOX-1 pourrait contribuer à l'élimination des LDL oxydées puisque son expression est régulée positivement en leur présence (Kume *et al.* 1998), et une étude réalisée avec des cellules endothéliales artéro-coronaires humaines a montré qu'une induction de l'expression de LOX-1 amenait une augmentation de la captation des LDL oxydées par ces cellules (Li *et al.* 1999).

Au niveau hépatique, les LOX₁ sont aussi métabolisées par la voie de la captation globale car on n'observe aucune différence entre la prise des parties protéique et lipidique. De façon étonnante, la perte du récepteur CD36 tend à augmenter le taux de captation des LOX₁ (figure 10B). Étant donné que les analyses de clairance plasmatique montrent une implication de CD36 dans la captation globale des LOX₁, nous nous attendions à une diminution de cette prise hépatique chez les souris CD36 (-/-). L'augmentation de la prise hépatique des LOX₁ chez les souris déficientes en CD36 pourrait être occasionnée par une meilleure habileté d'un ou d'autres récepteur(s) hépatique(s) à dégrader les LOX₁ en absence de CD36. Le récepteur *scavenger* LOX-1 est un candidat potentiel puisque ce récepteur est exprimé dans les organes vascularisés tel que le foie, et que des études ont montré son implication dans le métabolisme des LDL oxydées (Kume *et al.* 1998) (Li *et al.* 1999). D'un autre point de vue, ces résultats suggèrent aussi que le CD36 situé à des sites extra-hépatiques soit impliqué dans le catabolisme des LOX₁. Notre étude n'a cependant pas permis de visualiser ces sites extra-hépatiques, mais on peut penser aux

macrophages qui expriment ce récepteur *scavenger* et dont l'habileté à capter et dégrader les LDL oxydées a déjà été démontrée (Febbraio *et al.* 1999) (Nicholson *et al.* 2000). Étant un transporteur d'acides gras à longues chaînes, le récepteur CD36 est aussi exprimé dans d'autres organes comme le cœur (Coort *et al.* 2004) (Bodart *et al.* 2002), les tissus adipeux (Abumrad *et al.* 1993) et les muscles squelettiques (Luiken *et al.* 2000). Il serait ainsi possible que le CD36 situé à ces endroits soit impliqué dans le métabolisme des LOX₁.

Le métabolisme des FOX₁ est, chez les souris CD36 (-/-), similaire à ce qui a été retrouvé pour les souris sauvages, c'est-à-dire que ces lipoprotéines sont principalement éliminées via la voie de la captation globale. Par contre, un ralentissement de la vitesse de clairance des FOX₁ est observable chez ce génotype et l'écart entre les deux génotypes est encore plus visible lorsqu'une dose importante de FOX₁ est injectée (figures 11B et C). Il y a, en effet, une réduction de la vitesse de clairance de la partie protéique des FOX₁, et cet effet est d'autant plus remarqué pour la clairance de leur partie lipidique. Le récepteur CD36 contribue donc à la captation par la voie globale des FOX₁, mais les données quant à la participation du foie dans ce processus indiquent que le CD36 situé aux niveaux extra-hépatiques contribue davantage à la disparition de ces lipoprotéines de la circulation sanguine. Dans le même cas que pour les LOX₁, le cœur, les tissus adipeux, les muscles squelettiques et les macrophages sont des sites dans lesquels le CD36 est exprimé et ils sont donc des lieux pouvant jouer un rôle dans le métabolisme des FOX₁.

Effet de la méthode d'oxydation et de marquage radioactif sur les propriétés chimiques des LDL oxydées

Les présents résultats montrent que la méthode d'oxydation et de marquage radioactif affecte le degré d'oxydation des LDL. Les LOX₁ sont effectivement plus oxydées que les LOX₂ car leur migration relative sur gel agarose/barbital est plus grande que celle des LOX₂. Selon la figure 17, les LOX₁ présentent même une migration

électrophorétique relative se rapprochant à celle des FOX et suggère que les LOX₁ soient en fait des FOX ou du moins, très proches de l'être. Une hypothèse pouvant expliquer cette situation réside dans la méthode de marquage radioactif à l'¹²⁵I qui génère des effets oxydatifs au niveau protéique et lipidique des LDL (Romero *et al.* 2001) (Sobal *et al.* 2004). Selon nos résultats, il apparaît qu'un marquage préalable à l'¹²⁵I suivi d'une oxydation en présence de cuivre a un effet plus oxydatif sur les LDL que lorsque la procédure inverse de préparation des LOX est utilisée. Selon les travaux d'Esterbauer et son équipe (1992), la cinétique d'oxydation induite par le cuivre se caractérise par trois phases consécutives : la phase retardée, la phase de propagation et la phase de décomposition. La phase retardée et la phase de propagation s'effectuent relativement rapidement lors de l'oxydation de LDL pour atteindre un pic de peroxydation lipidique après une période d'environ 4 heures, où s'entame la période de décomposition. Ainsi, il se pourrait que notre procédure de préparation des LOX₁ ait produit des LDL se situant dans la même phase d'oxydation que les FOX (phase de décomposition), et que la méthode de préparation des LOX₂ ait donné des LDL en phase de propagation.

Toutefois, on observe dans le cas des différentes FOX générées, que les FOX₁ ont une migration relative plus petite que les FOX₂, ce qui indique que les FOX₂ sont plus oxydées que les FOX₁. Il est à noter que la même quantité de radioactivité (20 000 compte par minute) a été déposée sur le gel afin d'obtenir des résultats de même intensité par autoradiographie pour les préparations de LDL oxydées à différents degrés. La quantité d'iode libre ayant été considérée dans le calcul de la radioactivité à déposer sur gel pour chaque préparation, ce facteur n'est donc pas à être considéré. On remarque cependant que la préparation de FOX₁ présente une quantité de radioactivité inférieure aux autres préparations. Ceci pourrait s'expliquer par une trop forte oxydation des FOX₁, qui seraient dans ce cas, très décomposées. Ces lipoprotéines trop fortement décomposées et probablement très petites auraient migrées hors du gel et n'auraient pu être visualisées. Un gel d'électrophorèse non

dénaturant à gradients (NDGGE) aurait peut-être pu démontrer cette différence de taille entre les différentes préparations de lipoprotéines puisque ce type de gel permet de distinguer les molécules selon leur taille. Outre la migration relative des LDL oxydées à différents degrés, il aurait été intéressant de quantifier le niveau de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) puisque ce facteur est un indice de peroxydation lipidique et de stress oxydatif (Armstrong et Browne 1994) (Lefèvre *et al.* 1998).

Effet de la méthode d'oxydation et de marquage radioactif sur le métabolisme *in vivo* des LDL oxydées

Les données ont montré que les LOX₂ sont préférentiellement métabolisées par la voie de la captation sélective mais que les LOX₁, FOX₁ et FOX₂ sont plutôt métabolisées selon la voie de la captation globale. Si l'on retient l'hypothèse émise précédemment disant que les LOX₁ sont en réalité des FOX ou très proches de celles-ci, il n'est pas étonnant de voir que ces lipoprotéines se métabolisent de la même manière que les FOX. Dans le cas de la contribution hépatique dans le métabolisme des LOX, les résultats confirment les analyses de clairance et indiquent que le foie est le principal responsable de la prise des LOX₁ par la voie de la captation globale, et des LOX₂ par la voie de la captation sélective. On remarque aussi que les LOX₂ sont mieux captées au niveau du foie que les LOX₁, ce qui montre que les LOX₂ sont de meilleurs ligands pour les divers récepteurs hépatiques. Par contre, le CD36 hépatique n'est pas le récepteur impliqué majoritairement dans la prise des LDL légèrement oxydées car son absence améliore la captation de ces lipoprotéines au niveau du foie. Ainsi, l'importance de CD36 dans le métabolisme des LOX se situe davantage au niveau extra-hépatique qu'au niveau du foie. Bien que les LDL fortement oxydées s'éliminent principalement de la même façon du courant sanguin, c'est-à-dire par la voie de la captation globale, les FOX₁ et les FOX₂ sont métabolisées différemment par le foie. Le foie prend effectivement les FOX₁ par le processus de captation

globale, mais il prend préférentiellement les EC des FOX₂, que la molécule entière. Comme dans le cas des LOX, le CD36 ne contribue pas à la prise hépatique des FOX mais l'implication notable de ce récepteur dans leur métabolisme indique que son importance se situe ailleurs qu'au niveau hépatique. Dans ce cas également, le CD36 exprimé au niveau des macrophages pourrait avoir un rôle dans cette prise extra-hépatique. Une analyse simple consistant en l'injection des LDL oxydées marquées radioactivement suivi d'un isolement subséquent des macrophages péritonéaux pourrait permettre de vérifier cette théorie. De plus, des études ont démontré que les macrophages possèdent la capacité de capter les LDL oxydées, mais que ceux-ci présentent une défaillance pour la dégradation des LDL oxydées car ces lipoprotéines provoquent une expansion et une réduction de la densité des compartiments lysosomiaux des macrophages (Lougheed *et al.* 1999). Puisque l'accumulation accrue en EC par les macrophages induit leur différenciation en cellules spumeuses et éventuellement en athéromes (Klinkner *et al.* 1995), l'importance de CD36 dans le catabolisme des LDL oxydées au niveau extra-hépatique, et plus précisément au niveau des macrophages, indique que ce récepteur joue un rôle dans les stades précoces du développement de l'athérosclérose.

Vérification de l'implication du récepteur SR-BI dans le métabolisme des LDL oxydées

Les récents travaux de notre laboratoire (Bourret *et al.* 2006), quant au rôle du récepteur SR-BI dans le métabolisme *in vivo* des LOX, ont montré une absence d'implication de ce récepteur dans la captation sélective des EC provenant de ces lipoprotéines. Étant donné que les expérimentations actuelles montrent des différences de degré d'oxydation et de métabolisme entre les LOX₁ et les LOX₂, et que l'étude de Bourret et collaborateurs (2006) portait sur des LOX₁, nous avons investigué le rôle de SR-BI dans le métabolisme *in vivo* des LOX₂. De plus, afin de ralentir la clairance plasmatique des LOX₂ et de mieux visualiser l'effet potentiel,

nous avons ici employé la méthode d'injection avec bolus. Nos présents résultats confirment ceux que nous avons obtenus préalablement (Bourret *et al.* 2006) puisqu'ils indiquent que les LDL légèrement oxydées sont métabolisées par la voie de la captation sélective dans laquelle le récepteur SR-BI n'est pas impliqué.

Les récepteurs *scavengers* CD36 et SR-BI ne sont donc pas responsables de la captation sélective des LDL légèrement oxydées. La contribution notable du foie dans ce processus de prise sélective des EC des LOX suggère l'implication d'un ou d'autres récepteur(s) hépatique(s) encore non identifié(s) dans ce mécanisme. Par exemple, on pourrait penser aux récepteurs SR-A puisque ces récepteurs, considérés a priori comme étant des récepteurs associés aux macrophages, sont aussi exprimés au niveau du foie (Matsumoto *et al.* 1990), et plus particulièrement au niveau des cellules de Kupffer (van Berkel *et al.* 1991). Toutefois, les études de clairances plasmatiques ont montré que les SR-A n'avaient pas d'implication dans l'élimination des LOX (van Berkel *et al.* 1991) (Ling *et al.* 1997). Le récepteur macrosialine, l'homologue murin du récepteur CD68 que l'on retrouve chez l'humain, est aussi un récepteur potentiel puisqu'il est également exprimé au niveau des cellules de Kupffer et qu'il montre la capacité de lier les LDLox (Van Velzen *et al.* 1997). Le LOX-1 est un autre récepteur pouvant jouer un rôle dans la prise sélective de EC provenant des LDL légèrement oxydées car ce récepteur est exprimé au niveau du foie et que des études ont montré son implication dans le métabolisme des LDLox (Kume *et al.* 1998) (Li *et al.* 1999).

Dans le but de valider la capacité des LOX à transférer leurs EC par la voie de la captation sélective, quelques expériences pourraient être envisagées. Étant donné que le phénomène de captation sélective génère des lipoprotéines appauvries en EC, ces molécules deviennent plus petites lorsqu'elles retournent en circulation dans le courant sanguin. Dans le but de vérifier si les LOX sont bien appauvries en EC, il serait intéressant d'injecter des LOX à des souris sauvages, de récupérer ces

lipoprotéines potentiellement appauvries en EC, et de comparer sur NDGGE, leur taille avec celle de LOX non métabolisées par les souris. La caractérisation en contenu lipidique (quantité de cholestérol total, de CL et d'EC) de ces LOX appauvries pourrait ensuite être évaluée.

CONCLUSION

En somme, cette étude a permis de montrer que le CD36 nuit à la clairance des LDL natives, ce qui est en soit athérogène. Les LDL légèrement oxydées possèdent, quant à elles, la capacité de transférer sélectivement leurs esters de cholestérol par un mécanisme indépendant des récepteurs CD36 et SR-BI. Il n'a cependant pas été déterminé si les LOX appauvries en EC deviennent de meilleurs ligands pour un ou d'autres récepteur(s), et de quelle manière celui-ci (ceux-ci) les métabolise(nt). Bref, les LDL sont, en partie, éliminées par la voie de la captation sélective, mais leur oxydation progressive entraîne leur clairance via la captation globale. L'importance de CD36 dans l'élimination des LDL oxydées au niveau extra-hépatique par la voie de la captation globale, suggère une contribution de ce récepteur dans le développement de l'athérosclérose.

BIBLIOGRAPHIE

ABUMRAD, N., EL-MAGHRABI, M.R., AMRI, E., LOPEZ, E. et GRIMALDI, P. 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 17665-17668.

ABUMRAD, N., HARMON, C. et IBRAHIMI, A. 1998. Membrane transport of long-chain fatty acids : evidence for facilitated process. *Journal of Lipid Research* **39**: 2309-2318.

ACTON, S.L., SCHERER, P.E., LODISH, H.F. et KRIEGER, M. 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger-receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 21003-21009.

ARMSTRONG, D. et BROWNE, R. 1994. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **366**: 43-58.

AUSTIN, M.A., KING, M.D., VRANIZAN, K.M. et KRAUSS, R.M. 1990. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* **82**: 495-506.

BABITT, J., TRIGATTI, B., RIGOTTI, A., SMART, E.J., ANDERSON, R.G.W., XU, S. et KRIEGER, M. 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is *N*-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 13242-13249.

BALBIS, A., BAQUIRAN, G., MOUNIER, C. et POSNER, B.I. 2004. Effect of insulin on caveolin-enriched membrane domains in rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 39348-39357.

BENOIST, F., LAU, P., McDONNELL, M., DOELLE, H. et McPHERSON, R. 1997. Cholesteryl ester transfer protein mediates selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by human adipose tissue. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 23572-23577.

BODART, V., FEBBRAIO, M., DEMERS, A., McNICOLL, N., POHANCOVA, P., PERREAULT, A., SEJLITZ, T., ESCHER, E., SILVERSTEIN, R.L., LAMONTAGNE, D., ONG, H. 2002. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circulation Research* **90**: 844-849.

BOURRET, G., BRODEUR, M.R., LUANGRATH, V. LAPOINTE, J., FALSTRAULT, L. et BRISSETTE, L. 2006. *In vivo* cholesteryl ester selective uptake of mildly and standardly oxidized LDL occurs by both parenchymal and nonparenchymal mouse hepatic cells but SR-BI is only responsible for standardly oxidized LDL selective uptake by nonparenchymal cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38** : 1160-1170.

BRIAND, O., LESTAVEL, S., PILON, A., TORPIER, G., FRUCHART, J.C. et CLAVEY, V. 2003. SR-BI does not require raft/caveola localisation for cholesteryl ester selective uptake in the human adrenal cell line NCI-H295R. *Biochimica Biophysica Acta* **1631**: 42-50.

BRISSETTE, L. ROACH, P.D. et NOËL, S.-P. 1986. The effects of liposome-reconstituted apolipoproteins on the binding of rat intermediate density lipoproteins to rat liver membranes. *The Journal of Biological Chemistry* **261**: 11631-11638.

BRISSETTE, L. et FALSTRAULT, L. 1992. Analysis of the binding and association of human intermediate density lipoproteins to HepG2 cells. *Biochimica Biophysica Acta* **1165**: 84-92.

BRISSETTE, L. et FALSTRAULT, L. 1994. Analysis of the selective uptake of the cholesteryl esters of human intermediate density lipoproteins by HepG2 cells. *Biochimica Biophysica Acta* **1213**: 5-13.

BRISSETTE, L., CHAREST, M.C. et FALSTRAULT, L. 1996. Selective uptake of cholesteryl esters of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein-binding site in HepG2 cells and is followed by the hydrolysis of cholesteryl esters. *The Biochemical Journal* **318**: 841-847.

BRODEUR, M.R., LUANGRATH, V., BOURRET, G., FALSTRAULT, L. et BRISSETTE, L. 2005. Physiological importance of SR-BI in the *in vivo* metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *Journal of Lipid Research* **46**: 687-696.

BROWN, M.S. et GOLDSTEIN, J.L. 1979. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **76** : 3330-3337.

CALVO, D. et VEGA, M.A. 1993. Identification, primary structure and distribution of CLA-I, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 18929-18935.

CALVO, D., GÓMEZ-CORONADO, D., LASUNCION, M.A. et VEGA, M.A. 1997. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **17**:2341-2349.

CALVO, D., GÓMEZ-CORONADO, D., SUÁREZ, Y., LASUNCIÓN, M.A. et VEGA, M.A. 1998. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *Journal of Lipid Research* **39**: 777-788.

CAO, G., GARCIA, C.K., WYNE, K.L., SCHULTZ, R.A., PARKER, K.L. et HOBBS, H. 1997. Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 33068-33076.

CAREW, T.E., PITTMAN, R.C. et STEINBERG, D. 1982. Tissue sites of degradation of native and reductively methylated [¹⁴C]sucrose-labeled low density lipoprotein in rats. *The Journal of Biological Chemistry* **257**: 8001-8008.

CHAIT, A., BRAZG, R.L., TRIBBLE, D.L. et KRAUSS, R.M. 1993. Susceptibility of small, dense, low-density, lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *American Journal of Medicine* **94**: 350-356.

CHEN, S. et EVANS, G.A. 1990. A simple method for transgenic mice using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **8**: 32-33.

CHEN, M., YANG, Y., BRAUNSTEIN, E., GEORGESON, K.E. et HARMON, C.M. 2001. Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* **281**: 916-923.

CONNELLY, M.A., KLEIN, S.M., AZHAR, S., ABUMRAD, N.A. et WILLIAMS, D.L. 1999. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl esters uptake. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 41-47.

CONNELLY, M.A., KELLNER-WEIBEL, G., ROTHBLAST, G.H. et WILLIAMS, D.L. 2003. SR-BI-directed HDL-cholesteryl ester hydrolysis. *Journal of Lipid Research* **44**: 331-341.

COOPER, G.M. 1999. La cellule: une approche moléculaire. De Boeck-Wesmael Université. Bruxelles. 674p.

COORT, S.L., LUIKEN, J.J., VAN DER VUSSE, G.J., BONEN, A., GLATZ, J.F. 2004. Increased FAT (fatty acid translocase)/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in cardiac myocytes from obese Zucker rats. *Biochemical Society transactions* **32**:83-85.

CUSHING, S.D., BERLINER, J.A., VALENTE, A.J., TERRITO, M.C., NAVAB, M., PARHAMI, F., GERRITY, R., SCHWARTZ, C.J. et FOGELMAN, A.M. 1990. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**: 5134-5138.

DE-GRAFF, J., HENDRIKS, J.C., DEMECKER, P.N. et STALENHOF, A.F. 1993. Identification of multiple dense LDL subfractions with enhanced susceptibility to *in vitro* oxidation among hypertriglyceridemic subjects. *Arteriosclerosis and Thrombosis* **13**: 712-719.

DE VILLIERS, W.J.S., CAI, L., WEBB, N., DE BEER, M. VAN DER WESTHUYZEN, D.R. et DE BEER, F.C. 2001. CD36 does not play a direct role in HDL or LDL metabolism. *Journal of Lipid Research* **42**: 1231-1238.

DE WINTHER, M.P.J., WILLEMS VAN DIJK, K., VAN VLIJMEN, B.J.M., GIJBELS, M.J.J., HEUS, J.J., WIJERS, E.R., VAN DEN BOS, A.C., BREUER, M., FRANTS, R.R., HAVEKES, L.M. et HOFKER, M.H. 1999. Macrophage specific overexpression of the human macrophage scavenger receptor in transgenic mice, using a 180 kb yeast artificial chromosome, leads to enhanced foam cell formation of isolated peritoneal macrophages. *Atherosclerosis* **147**: 339-347.

DIETSCHY, J.M., TURLEY, S.D. et SPADY, D.K. 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *Journal of Lipid Research* **34**: 1637-1659.

DOI, T., HIGASHINO, K., KURIHARA, Y., WADA, Y., MIYAZAKI, T., NAKAMURA, H., UESUGI, S., IMANISHI, T., KAWABE, Y., ITAKURA, H. YAZAKI, Y., MATSUMOTO, A. et KODAMAG, T. 1993. Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by

macrophage scavenger receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 2126-2133.

EISENBERG, S. 1984. High density lipoprotein metabolism. *Journal of Lipid Research* **25**: 1017-1058.

ENDEMANN, G, STANTON, L.W., MADDEN, K.S., BRYANT, C.M., WHITE, R.T. et PROTTER, A.A. 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 11811-11816.

ESTERBAUER, H., GEBICKI, J., PUHL, H. ET JURGENS, G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxydative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine* **13**: 341-390.

FEBBRAIO, M., ABUMRAD, N.A., HAJJAR, D.P., SHARMA, K., CHENG, W., FRIEDA, S., PEARCE, A. et SILVERSTEIN, R.L. 1999. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 19055-19062.

FEBBRAIO, M., PODREZ, E.A., SMITH, J.D., HAJJAR, D.P., HAZEN, S.L., HOFF, H.F., SHARMA, K. et SILVERSTEIN, R.L. 2000. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *Journal of Clinical Investigation* **105**:1049-1056.

FEBBRAIO, M., HAJJAR, D.P. et SILVERSTEIN, R.L. 2001. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *The Journal of Clinical Investigation* **108**: 785-791.

FIELDING, C.J. 1993. Molecular aspects of reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis Review* **24**: 75-85.

FIELDING, P.E. et FIELDING, C.J. 1996. Dynamics of lipoprotein transport in the human circulatory system. In: *Biochemistry of lipids and membranes*. New York: D.E. Vance and J.E. Vance. 593 pp

FLUITER, K., VIETSH, H., BIESSEN, E.A., KOSTNER, G.M., VAN BERKEL, T.J., et SATTLER, W. 1996. Increased selective uptake in vivo and in vitro of oxidized cholesteryl esters from high-density lipoprotein by rat liver parenchymal cells. *Biochemical Journal* **319**: 471-476.

FLUITER, K., VAN DER WESTHUIJZEN, D.R. et BERKEL, T.J.C. 1998. *In vivo* regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and kupffer cells. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 8434-8438.

FLUITER, K., SATTLER, W., DE BEER M.C., CONNELL, P.M., VAN DER WESTHUYZEN, D.R et, VAN BERKEL, T.J. 1999. Scavenger receptor BI mediates the selective uptake of oxidized cholesterol esters by rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 8893-8899.

FREEMAN, M., EKKEL, Y., ROHRER, L., PENMAN, M., FREEDMAN, N.J., CHISOLM, G.M. et KRIEGER, M. 1991. Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**:4931-4935.

GALAENO, N.F., MILNE, R., MARCEL, Y.L., WALSH, M.T., LEVY, E., NGUYEN, T.D., GLEESON, A. ARAD, Y., WITT, L., AL-HAIDERI, M., RUMSEY, S.C. et DECKELBAUM, R.J. 1994. Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL) is modified in small LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 511-519.

GILLOTTE-TAYLOR, K., BOULLIER, A., WITZTUM, J.L., STEINBERG, D. et QUEHENBERGER, O. 2001. Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Journal of Lipids Research* **42**: 1474-1482.

GLASS, C., PITTMAN, R.C., CIVEN, M. et STEINBERG, D. 1985. Uptake of High- density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat *in vivo* and by adrenal cells and hepatocytes *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* **260**: 744-750.

GOLDSTEIN, J.L., DANA, S.E. et BROWN, M.S. 1974. Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **71**: 4288-4292.

GRANOT, E., TABAS, I. et TALL, A.R. 1987. Human plasma cholesteryl ester transfer protein enhances the transfer of cholesteryl ester from high density lipoproteins into cultured HepG2 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 3482-3487.

GREENWALT, D., LIPSKY, R., OCKENHOUSE, C., IKEDA, H., TANDON, N. et JAMIESON, G. 1992. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* **80**: 1105-1115.

GU, X., TRIGATTI, B., XU, S., BABITT, J. et KRIEGER, M. 1998. The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 26338-26348.

HAMMAD, S.M., STEFANSSON, S., TWAL, W.O., DRAKE, C.J., FLEMING, P., REMALEY, A., BREWER, H.B. et ARGRAVES, W.S. 1999. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B12 complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**:10158-10163.

HATCH, F.T. et LEES, R.S. 1968. Practical methods for plasma lipoprotein structure. *Advances in Lipid Research* **6**: 1-68.

HORTON, H.R., MORAN, L.A., OCHS, R.S., RAWN, J.D. et SCRIMGEOUR, K.G. 1994. Principes de biochimie. De Boeck-Wesmael Université. Bruxelles. 720p.

HUSSAIN, M.M., MAXFIELD, F.R., MAS-OLIVA, J., TABAS, I., JI, Z.S., INNERARITY, T.L. et MAHLEY, R.W. 1991. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein-alpha 2-macroglobulin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 13936-13940.

ITABE, H. et TAKANO, T. 2000. Oxidized low density lipoprotein : the occurrence and metabolism in circulation and in foam cells. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **7**: 123-131.

JIALAL, I. et CHAIT, A. 1989. Differences in the metabolism of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein by human endothelial cells : inhibition of cholesterol esterification by oxidatively modified low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research* **30**: 1561-1568.

JONES, A.L., HRADEZ, G.T., HORNICK, C., RENAUD, G., WINDLER, E.E.T. et HAVEL, R.J. 1984. Uptake and processing of remnants of chylomicrons and very low density lipoproteins by rat liver. *Journal of Lipid Research* **25**: 419-429.

- KLINKNER, A.M., WAITES, C.R., KERNS, W.D. et BUJELSKI, P.J. 1995. Evidence of foam cell and cholesterol crystal formation in macrophages incubated with oxidized LDL by fluorescence and electron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **43**: 1071-1078.
- KODAMA, T., FREEMAN, M., ROHRER, L., ZABRECKY, J., MATSUDAIRA, P. et KRIEGER, M. 1990. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* **343**: 531-535.
- KOZARSKY, K.F., DONAHEE, M.H., RIGOTTI, A., IQBAL, S.N., EDELMAN, E.R. et KRIEGER, M. 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* **387**: 414-417.
- KUME, N., MURASE, T., MORIWAKI, H., AOYAMA, T., SAWAMURA, T., MASAKI, T. et KITA, T. 1998. Inductible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circulation Research* **83**: 322-327.
- KUNJATHOOR, V.V., FEBBRAIO, M., PODREZ, E.A., MOORE, K.J., ANDERSSON, L., KOEHN, S., RHEE, J.S., SILVERSTEIN, R., HOFF, H.F. et FREEMAN, M.W. 2002. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 49982-49988.
- LANGER, T.W., STROKER, W. et LEVY, R.I. 1972. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *The Journal of Clinical Investigation* **54**: 1528-1536.
- LAPOINTE, J., TRUONG, T.-Q., FALSTRAULT, L. et BRISSETTE, L. 2006. Differential abilities of mouse liver parenchymal and nonparenchymal cells in HDL and LDL (native and oxidized) association and cholesterol efflux. *Biochemistry and Cell Biology* **84**: 250-256.
- LEFÈVRE, G. BELJEAN-LEYMARIE, M., BEYERLE, F., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., CRISTOL, J.P., THEROND, P. et TORREILLES, J. 1998. Évaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de Biologie Clinique* **56**: 305-319.
- LI, Y.S., SHYY, Y.J., WRIGHT, J.G., VALENTE, A.J., CORNHILL, J.F. et KOLATTUKUDY, P.E. 1993. The expression of monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human vascular endothelium *in vitro* and *in vivo*. *Molecular and Cellular Biochemistry* **126**: 61-68.

- LI, D.Y., ZHANG, Y.C., PHILIPS, M.I., SAWAMURA, T. et MEHTA, J.L. 1999. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circulation Research* **84**: 1043-1049.
- LING, W.H., LOUGHEED, M., SUZUKI, H., BUCHAN, A., KODAMA, T. et STEINBRECHER, U.P. 1997. Oxidized or acetylated low density lipoproteins are rapidly cleared by the liver in mice with disruption of the scavenger receptor class A type I/II gene. *The Journal of Clinical Investigation* **100**:244-252.
- LOUGHEED, M. et STEINBRECHER, U.P. 1996. Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 11798-11805.
- LOUGHEED, M., LUM, C.M., LING, W., SUZUKI, H., KODAMA, T. et STEINBRECHER, U. 1997. High affinity saturable uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages from mice lacking the scavenger receptor class A type I/II. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 12938-12944.
- LOUGHEED, K.L., MOORE, E.D., SCRIVEN, D.R. et STEINBRECHER, U.P. 1999. Uptake of oxidized LDL by macrophages differs from that of acetyl LDL and leads to expansion of an acidic endolysosomal compartment. *Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **19**: 1881-1890.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
- LUIKEN, J.J., GLATZ, J.F., BONEN, A. 2000. Fatty acid transport proteins facilitate fatty acid uptake in skeletal muscle. *Canadian Journal of Applied Physiology* **25**:333-352.
- LUSKEY, K.L., FAUST, J.R., CHIN, D.J., BROWN, M.S. et GOLDSTEIN, J.L. 1983. Amplification of the gene for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, but not for the 53-kDa protein, in UT-1 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **258**: 8462-8469.
- MACKNESS, M.I. et DURRINGTON, P.N. 1995. Lipid transport and lipoprotein metabolism. In: Oxidative stress, lipoprotein and cardiovascular dysfunction. London UK: Portland Press: 33-53.

MAENO, Y., FUJIOKA, H., HOLLINGDALE, M.R., OCKENHOUSE, C.F., NAKAZAWA, S. et AIKAWA, M. 1994. Ultrastructural localization of CD36 in human hepatic sinusoidal lining cells, hepatocytes, human hepatoma (HepG2-A16) cells, and C32 amelanotic melanoma cells. *Experimental Parasitology* **79**: 283-290.

MAHLEY, R.W. 1988. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**: 622-630.

MATSUMOTO, A., NAITO, M., ITAKURA, H., IKEMOTO, S., ASAOKA, H., HAYAKAWA, I., KANAMORI, H., ABURATANI, H., TAKAKU, F., SUZUKI, H., KOBARI, Y., MIYAI, T., TAKAHASHI, K., COHEN, E.H., WYDRO, R., HOUSMAN, D.E. et KODAMA, T. 1990. Human macrophage scavenger receptors : primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**: 9133-9137.

McFARLANE, A.S. 1958. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* **182**: 53-54.

MITTENDORFER, B. 2005. Sexual dimorphism in human lipid metabolism. *The Journal of Nutrition* **135**: 681-686.

MEHTA, J.L. et LI, D.Y. 1998. Identification and autoregulation of receptor for ox-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **248**: 511-514.

NAITO, M., KODAMA, T., MATSUMOTO, A., DOI, T., et TAKAHASHI, K. 1991. Tissue distribution, intracellular localization, and *in vitro* expression of bovine macrophage scavenger receptors. *American Journal of Pathology* **139**: 1411-1423.

NICHOLSON, A.C. FRIEDA, S., PEARCE, A. ET SILVERSTEIN, R.L. 1995. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines: evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **15**:269-275.

NICHOLSON, A.C., FEBBRAIO, M., HAN, J., SILVERSTEIN, R.L. et HAJJAR, D.P. 2000. CD36 in atherosclerosis: the role of a class B macrophage scavenger receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* **202**: 128-131.

NISHIKAWA, K., ARAI, H. et INOUE, K. 1990. Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* **9**: 5226-5231.

NOZAKI, S., KASHIWAGI, H., YAMASHITA, S., NAKAGAWA, T., KOSTNER, B., TOMIYAMA, Y., NAKATA, A., ISHIGAMI, M., MIYAGAWA, J., KAMEDA-TAKEMURA, K., *et al.* 1995. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *The Journal of Clinical Investigation* **96**: 1859-1865.

OQUENDO, P., HUNDT, E., LAWLER, J. et SEED, B. 1989. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* **58**: 95-101.

PALINSKI, W., ROSENFELD, M.E., YLÄ-HERTTUALA, S., GURTNER, G.C., SOCHER, S.S., BUTLER, S.W., PARTHASARATHY, S., CAREW, T.E., STEINBERG, D. et WITZTUM, J.L. 1989. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **86**: 1372-1376.

PITAS, R.E., INNERARITY, T.L. et MAHLEY, R.W. 1980. Cell surface receptor binding of phospholipid: protein complexes containing different ratios of receptor-active and -inactive E apoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* **255**: 5454-5460.

PITTMAN, R.C., CAREW, T.E., ATTIE, A.D., WITZTUM, J.L., WATANABEG, Y. et STEINBERG, D. 1982. Receptor-dependent and receptor-independent degradation of low density lipoprotein in normal rabbits and in receptor-deficient mutant rabbits. *The Journal of Biological Chemistry* **257**: 7994-8000.

PITTMAN, R.C., KNECHT, T.P., ROSENBAUM, M.S. et TAYLOR, C.A. 1987. A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 2443-2450.

RAJAVASHISTH, T.B., ANDALIBI, A., TERRITO, M.C., BERLINER, J.A., NAVAB, M., FOGELMAN, A.M. et LUSIS, A.J. 1990. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* **344**: 254-257.

RAZANI, B. et LISANTI, M.P. 2001. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* **108**: 1533-1561.

REAVEN, P., PARTHASARATHY, S., GRASSE, B.J., MILLER, E., STEINBERG, D. et WITZTUM, J.L. 1993. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *The Journal of Clinical Investigation* **91**: 668-676.

- REN, Y., SILVERSTEIN, R.L., ALLEN, J. et SAVILL, J. 1995. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* **181**: 1857-1862.
- RHAINDS, D., FALSTRAULT, L., TREMBLAY, C. et BRISSETTE, L. Uptake and fate of class B scavenger receptor ligands in HepG2 cells. 1999. *European Journal of Biochemistry* **261**: 227-235.
- RHAINDS, D., BRODEUR, M., LAPOINTE, J., CHARPENTIER, D., FALSTRAULT, L. et BRISSETTE, L. 2003. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor classe B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry* **42**: 7527-7538.
- RHAINDS, D., BOURGEOIS, P., BOURRET, G., HUARD, K., FALSTRAULT, L. et BRISSETTE, L. 2004. Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *Journal of Cell Science* **117**: 3095-3105.
- RIGOTTI, A., ACTON, S.L. et KRIEGER, M. 1995. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 16221-16224.
- RIGOTTI, A., TRIGATTI, B.L., PENMAN, M., RAYBURN, H., HERZ, J. et KRIEGER, M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 12610-12615.
- ROMERO, J.R., MARTINEZ, R., FRESNEDO, O. et OCHOA, B. 2001. Comparison of two methods for radioiodination on the oxidizability properties of low density lipoprotein. *Journal of Physiology and Biochemistry* **57**: 291-301.
- ROBERTS, D.C.K., MILLER, N.E., PRICE, S.G.L., CROOK, D., CORTESE, C., LA VILLE, A., MASANA, L. et LEWIS, B. 1985. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins *in vitro*. *The Biochemical Journal* **226**: 319-322.
- RUSSELL, D.W., YAMAMOTO, T., SCHNEIDER, W.J., SLAUGHTER, C.J., BROWN, M.S. et GOLDSTEIN, J.L. 1983. cDNA cloning the bovine low density lipoprotein receptor: feedback regulation of a receptor mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **80**: 7501-7505.

SAKAGUCHI, H., TAKEYA, M., SUZUKI, H., HAKAMATA, H., KODAMA, T., HORIUCHI, S., GORDON, S., VAN DER LAAN, L.J., KRAAL, G., ISHIBASHI, S., KITAMURA, N. et TAKAHASHI, K. 1998. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Laboratory Investigation* **78**: 423-434.

SALTER, A.M., WIGGINS, D., SESSIONS, V.A. et GIBBONS, G.F. 1998. The intracellular triacylglycerol/fatty acid cycle: a comparison of its activity in hepatocytes which exclusively apolipoprotein (apo) B₁₀₀ very-low-density lipoprotein (VLDL) and in those which predominantly apoB₄₈ VLDL. *The Biochemical Journal* **332**: 667-672.

SANTAMARIA-FOJO, S. et BREWER, H.B.Jr. 1991. The familial hyperchylomicronemia syndrome. New insights into underlying genetic defects. *Journal of the American Medical Association* **265**: 904-908.

SAWAMURA, T., KUME, N., AOYAMA, T., MORIWAKI, H., HOSHIKAWA, H., AIBA, Y., TANAKA, T., MIWA, S., KATSURA, Y., KITA, T. et MASAKI, T. 1997. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* **386**: 73-77.

SHAFI, S., BRADY, S.E., BENSADOUN, A. et HAVEL, R.J. 1994. Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver. *Journal of Lipid Research* **35**: 709-720.

SOBAL, G., RESCH, U. et SINZINGER, H. 2004. Modification of low-density lipoprotein by different radioiodination methods. *Nuclear Medicine and Biology* **31**: 381-388.

STEINBRECHER, U.P. 1987. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 3603-3608.

STRAUSS, J.G., ZIMMERMANN, R., HRZENJAK, A., ZHOU, Y., KRATKY, D., LEVAK-FRANK, S., KOSTNER, G.M., ZECHNER, R. et FRANK, S. 2002. Endothelial cell-derived lipase mediates uptake and binding of high-density lipoprotein (HDL) particles and the selective uptake of HDL-associated cholesterol esters independent of its enzymic activity. *The Biochemical Journal* **368**: 69-79.

SUZUKI, H., KURIHARA, Y., TAKEYA, M., KAMADA, N., KATAOKA, M., JISHAGE, K., UEDA, O., SAKAGUCHI, H., HIGASHI, T., SUZUKI, T., TAKASHIMA, Y., KAWABE, Y., CYNISHI, O., WADA, Y., HONDA, M., KURIHARA, H., ABURATANI, H., DOI, T., MATSUMOYO, A., AZUMA, S.,

NODA, T., TOYOTA, Y., ITAKURA, H., YAZAKI, Y., HORIUCHI, S., TAKAHASHI, K., KAR KRUIJT, J., VAN BERKEL, T.J.C., STEINBRECHER, U.P., ISHIBASHI, K., MAEDA, N., GORDON, S. et KODAMA, T. 1997. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* **386**: 292-296.

SWARNAKAR, S., TEMEL, R.E., CONNELLY, M.A., AZHARS, S. et WILLIAMS, D.L. 1999. Scavenger receptor class B type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesterol ester. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 29733-29739.

TALLE, M.A., RAO, P.E., WESTBERG, E., ALLEGAR, N., MAKOWSKI, M., MITTLER, R.S. et GOLDSTEIN, G. 1983. Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. *Cellular Immunology* **78**: 83-99.

TERPSTRA, V., VAN AMERSFOORT, E.S., VAN VELZEN, A.G., KUIPER, J. et VAN BERKEL, T.J.C. 2000. Hepatic and extrahepatic scavenger receptors, function in relation to disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **20**: 1860-1872.

TOSHIMA, S., HASEGAWA, A., KURABAYASHI, M., ITABE, H. TAKANO, T., SUGANO, J., SHIMAMURA, K., KIMURA, J., MICHISHITA, I., SUZUKI, T. et NAGAI, R. 2000. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **10**: 2243-2247.

UEDA, Y., ROYERS, L. GONG, E., ZHANG, J., COOPER, P.N., FRANCONI, O. et RUBIN, E.M. 1999. Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 7165-7171.

VAN BERKEL, T.J., DE RIJKE, Y.B. et KRUIJT, J.K. 1991. Different fate *in vivo* of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 2282-2289.

VAN VELZEN, A.G., DA SILVA, R.P., GORDON, S. et VAN BERKEL, T.J. 1997. Characterization of a receptor for oxidized low-density lipoproteins on rat Kupffer cells : similarity to macrosialin. *The Biochemical Journal* **322**: 411-415.

WANG, N., ARAI, T., JI, Y., RINNINGER, F. et TALL, A. 1998. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density

lipoprotein apoB, low density lipoprotein apoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 32920-32926.

WEBB, N.R., DE BEER, M.C., YU, J., KINDY, M., DAUGHERTY, A., VAN DER WESTHUYZEN, D.R. et DE BEER, F.C. 2002. Overexpression of SR-BI by adenoviral vector promotes clearance of apoA-I, but not apoB, in human apoB transgenic mice. *Journal of Lipid Research* **43**: 1421-1428.

WINDLER, E., CHAO, Y.-S. et HAVEL, R.J. 1980a. Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* **255**: 8303-8307.

WINDLER, E., KOVANEN, P.T, CHAO, Y.-S., BROWN, M.S., HAVEL, R.J. et GOLDSTEIN, J.L. 1980b. The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *The Journal of Biological Chemistry* **255**: 10464-10471.

WINDLER, E., GREEVE, J., DAERR, W.H. et GRETEN, H. 1988. Binding of rat chylomicrons and their remnants to the hepatic low-density-lipoprotein receptor and its role in remnant removal. *Biochemical Journal* **252**: 553-561.

XU, S., LACCOTRIPE, M., HUANG, X., RIGOTTI, A., ZANNIS, V.I. et KRIEGER, M. 1997. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *Journal of Lipid Research* **38**: 1289-1298.

YLÄ-HERTTUALA, S., PALINSKI, W., ROSENFELD, M.E., PARTHASARATHY, S., CAREW, T.E., BUTLER, S., WITZTUM, J.L. et STEINBERG, D. 1989. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *The Journal of Clinical Investigation* **84**: 1086-1095.

YOUNG, I.S. et McENENY, J. 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions* **29**: 358-362.

ZENG, Y., ZHAO, G., QIAN, J., WANG, Z. et SHE, M. 2002. Effect of oxLDL on the uptake and clearance rate of cholesterol in v-SMC originated from human apoA1 transgenic mice. *Chinese Medical Journal* **115**: 584-588.

ZHANG, H., YANG, Y. et STEINBRECHER, U.P. 1993. Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 5535-5542.