HAL
open science

Mécanismes de l'hyperlipidémie provoquée par les immunosuppresseurs

Yann Gueguen

To cite this version:

Yann Gueguen. Mécanismes de l'hyperlipidémie provoquée par les immunosuppresseurs. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2003. Français. NNT : 2003NAN10250 . tel-01746939

HAL Id: tel-01746939

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746939v1

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I
2003

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 27 mars 2003

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARE- NANCY I

Mention Sciences du Médicament

Par

Yann GUEGUEN

Né le 11 juillet 1973

DB 28348

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Métabolisme et Mécanismes d'action des Médicaments - Pharmacologie Clinique

Sujet :

MECANISMES DE L'HYPERLIPIDEMIE PROVOQUEE PAR LES IMMUNOSUPPRESSEURS

MEMBRES DU JURY

JUGES	Monsieur le Professeur Gérard SIEST	(Nancy, France)
	Mademoiselle le Professeur Anne-Marie BATT	(Nancy, France)
	Monsieur le Docteur Michel PARQUET	(Orsay, France)
	Monsieur le Docteur Luc FERRARI	(Nancy, France)
RAPPORTEURS	Monsieur le Professeur Jean-Marc LOBACCARO	(Aubière, France)
	Madame le Professeur Vera RIBEIRO MARQUES	(Algarve , Portugal)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier,

Monsieur le Professeur G. SIEST et Madame le Docteur S. VISVIKIS pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et donné les moyens de mener à bien ce travail. Que la confiance qu'ils m'ont accordés trouve écho dans ce travail.

Madame le Professeur V.L. RIBEIRO MARQUES et Monsieur le Professeur J-M. LOBACCARO pour l'honneur qu'ils me font d'être les rapporteurs de cette thèse.

Monsieur le Docteur M. PARQUET pour son aide, les discussions scientifiques, et l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail. Qu'il soit assuré de mon profond respect.

Mademoiselle le Professeur A-M. BATT et Monsieur le Docteur L. FERRARI pour avoir suivi ce travail de thèse et pour l'aide qu'ils m'ont apporté tout au long de ces années. Qu'ils trouvent dans ce travail toute ma considération et le résultat de plus de trois ans de collaboration.

Qu'il me soit également permis de remercier,

Monsieur le Docteur G. CONSCIENCE de Wyeth-Lederle pour m'avoir permis de réaliser ce projet. Je souhaiterais également remercier Wyeth-Lederle pour le financement de ces travaux.

Monsieur le Professeur C. LUTTON pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire lors de trois stages, pour l'aide et le soutien chaleureux qu'il m'a accordé, pour l'efficacité et la chaleur humaine que j'ai trouvé au sein de son équipe.

Monsieur le Docteur M. SOUIDI, pour m'avoir initié au domaine des acides bilaires ainsi que pour son aide, sa disponibilité et sa sympathie. Qu'il trouve dans ce travail toute mon amitié et le résultat d'une étroite collaboration.

Monsieur le Docteur Philippe BERTRAND pour m'avoir initié à la recherche ainsi que pour sa disponibilité, son amitié, ses conseils et ses connaissances.

Le Centre de Médecine Préventive (CMP) de Vandoeuvre-les-Nancy qui était à l'origine de ce projet en collaboration avec le laboratoire Wyeth et son personnel pour leur aide technique dans le dosage des apolipoprotéines.

J'ai une pensée spéciale pour toutes les personnes du laboratoire de l'INSERM U525 à Nancy qui m'ont soutenu et conseillé et plus particulièrement Anne, Suzanne, Céline, Catherine, Christine, Nicolas.

SOMMAIRE

HYPOTHESES DE TRAVAIL 1

SITUATION DU SUJET 3

I. Mode d'action et effets indésirables des immunosuppresseurs 3
1.1. La ciclosporine A 3
1.2. La rapamycine 4

II. Biosynthèse et transport du cholestérol 7
II.1. Biosynthèse du cholestérol 7
II.1.1. Généralités
II.1.2. Régulation de l'HMG-CoA réductase
II.1.2.1. Rétrocontrôle de l'HMG-CoA réductase
II.1.2.2. Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'HMGR
II.2. Transport du cholestérol 10
II.2.1. Rôle des lipoprotéines
II.2.1.1. Les chylomicrons
II.2.1.2. Les VLDL
II.2.1.3. Les LDL
II.2.1.4 Les HDL
II.2.2. Rôles des apolipoprotéines
II.2.3. Les récepteurs des lipoprotéines
II.2.3.1. Le récepteur des LDL
II.2.3.2. Le récepteur des HDL
II.2.4. Le transporteur ABCA1
II.2.4.1. Généralités
II.2.4.2. Régulation de ABCA1
II.2.4.3. Pathologies associées à ABCA1

III. Mécanismes des hyperlipidémies dues aux immunosuppresseurs 21
(Revue THERAPIE)
III.1. Effets hyperlipémiants des immunosuppresseurs 24
III.2. Effet sur le catabolisme du cholestérol 26
III.2.1. La voie neutre (classique) de la biosynthèse des acides biliaires
III.2.1.1. La cholestérol 7α-hydroxylase (CYP7A1)
III.2.1.2. La stérol 12α-hydroxylase (CYP8B1)
III.2.2. La voie acide (alternative) de la biosynthèse des acides biliaires
III.2.2.1. La stérol 27-hydroxylase (CYP27A1)
III.2.2.2. L'oxystérol 7α-hydroxylase (CYP 7B)
III.3. Effet sur les récepteurs des lipoprotéines 28
III.3.1. Le récepteur des LDL
III.3.2. Le récepteur des HDL
III.4. Effet sur le transport des acides biliaires et des lipoprotéines 30
III.4.1. Transport des acides biliaires
III.4.2. Transport du cholestérol et des triglycérides par les apolipoprotéines
III.5. Mécanismes de l'hypertryglycéridémie 32

IV. Régulation du catabolisme du cholestérol 35
(Revue REGARD SUR LA BIOCHIMIE)
IV.1. La voie neutre et sa régulation 38
IV.1.1. La cholestérol 7α-hydroxylase (CYP7A1)
IV.1.1.1. Régulation transcriptionelle,
IV.1.1.2. Polymorphismes du CYP7A1
IV.1.2. La stérol 12α-hydroxylase (CYP8B1)
IV.2. La voie acide et sa régulation 41
IV.2.1. La stérol 27hydroxylase (CYP27A1)
IV.2.1.1. La xanthomatose cérébrotendineuse,
IV.2.1.2. Régulation transcriptionelle
IV.2.1.3. Implication dans l'homéostasie du cholestérol
IV.2.2. L' oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1)
IV.3. Rôle des récepteurs nucléaires « orphelins » 44
IV.3.1. FXR
IV.3.2. LXR
IV.3.3. PXR

MATERIEL & METHODES 52
52

I. Culture cellulaire
I.1. Matériel et solutions
I.2. Décongélation et amplification cellulaire
I.3. Traitements des cellules
I.4. Récupération des cellules
I.5. Dosage de l'activité LDH
54

II. Techniques de biologie moléculaire
II.1. Extraction des ARN totaux
II.2. RT-PCR
II.2.1. Transcription inverse
II.2.2. Réaction de polymérisation en chaîne – *i-Cycler*
II.2.3. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel– *LightCycler*
60

III. Méthodes biochimiques
III.1. Séparation sub-cellulaire
III.1.1. Préparation des microsomes
III.1.2. Préparation des mitochondries
III.2. Dosage des protéines
III.3. Dosage des paramètres lipidiques
III.3.1. Dosage des triglycérides et du cholestérol
III.3.2. Dosage des apolipoprotéines AI, B100, CIII et E
64

IV. Activités enzymatiques
IV.1. Enzymes du métabolisme des acides biliaires
IV.1.1. Dosage de la stérol 27-hydroxylase
IV.1.2. Dosage de la cholestérol 7α-hydroxylase
IV.1.3. Dosage de l'oxystérol 7α-hydroxylase
IV.2. Dosage de l'HMG-CoA réductase

RESULTATS & DISCUSSION 70

I. Etude de l'inhibition de l'activité stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) par la RAPA et la CsA dans les mitochondries de cellules HepG2 70

Publication 1:
Rapamycin is a weak inhibitor of CYP27A1 (sterol 27-hydroxylase) in HepG2 mitochondria. (Soumis à Life Sciences) 74

II. Effets de la RAPA et de la CsA sur les activités CYP7A1, CYP7B1 et HMG-CoA réductase 75

II.1. Effet sur les activités CYP7A1 et CYP7B1 75
II.2. Effet sur l'activité HMG-CoA réductase 77

III. Effets de la CsA et de la RAPA sur l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires ainsi que sur la sécrétion d'apolipoprotéines 79

Publication 2:
Effects of rapamycin and cyclosporine on cholesterol transport and major apolipoproteins secretion by Hep G2 cells. En préparation 86

III. Effets de la CsA et de la RAPA sur l'expression de différents récepteurs nucléaires impliqués dans l'homéostasie lipidique et le métabolisme des acides bilaires 87

IV.1. Effet sur l'expression de PXR 87
IV.2. Effet sur l'expression de LXRα 88

CONCLUSION & PERSPECTIVES 91

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 96

AUTRES TRAVAUX 111

Publication 3:
Control of apolipoprotein E secretion by 25-hydroxycholesterol and pro-inflammatory cytokines in the human astrocytoma cell line CCF-STTG1
Y Gueguen, P Bertrand, L Ferrari, AM Batt and G Siest
Cell Biol Toxicol. 2001;17(3):191-9.

Publication 4:
U373-MG response to interleukin-1beta-induced oxidative stress.
Malaplate-Armand C, Gueguen Y, Bertrand P, Ferrari L, Batt AM.
Cell Biol Toxicol. 2000;16(3):155-63.

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

LISTE DES PUBLICATIONS

GUEGUEN Y, FERRARI L, SOUIDI M, BATT A-M, LUTTON C, SIEST G AND VISVIKIS S. Rapamycin is a weak inhibitor of CYP27A1 (sterol 27-hydroxylase) in HepG2 mitochondria. *Soumis à Lifes Sciences.*

GUEGUEN Y, FERRARI L, BATT A-M, SIEST G AND VISVIKIS S. Effect of rapamycin and cyclosporine on the cholesterol transport and major apolipoproteins secretion by HepG2 cells. *En préparation.*

GUEGUEN Y, FERRARI L, BATT AM.
Régulation du catabolisme du cholestérol. Implication des récepteurs nucléaires. *Regard sur la biochimie (Février 2003).*

GUEGUEN Y, FERRARI L, BATT AM. Mécanismes des hyperlipidémies dues aux immunosuppresseurs
Soumis à Thérapie.

GUEGUEN Y, BERTRAND P, FERRARI L, BATT AM, SIEST G. Control of apolipoprotein E secretion by 25-hydroxycholesterol and proinflammatory cytokines in the human astrocytoma cell line CCF-STTG1. *Cell Biol Toxicol 2001;17(3):191-9*

MALAPLATE-ARMAND C, GUEGUEN Y, BERTRAND P, FERRARI L, BATT AM. U373-MG response to interleukin-1beta-induced oxidative stress. *Cell Biol Toxicol 2000;16(3):155-6.*

LISTE DES COMMUNICATIONS

GUEGUEN Y, FERRARI L, BATT AM, SIEST G, VISVIKIS S
Inhibition de la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) par les immunosuppresseurs. Comparaison de la cyclosporine et de la rapamycine.
SPTC Toulouse, France (septembre 2001)

GUEGUEN Y, FERRARI L, SOUIDI M, LUTTON C, BATT AM
Inhibition of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) by immunosuppressive drugs. Comparison of Rapamycin and cyclosporine A.
FALK symposium n°129, Freibourg, Germany (juin 2002)

GUEGUEN Y
DEA Pharmacologie « *Le métabolisme P450-dépendant du cholestérol. Physiologie et effets inattendus de médicaments* »
Faculté de Pharmacie, UHP Nancy I (2001, 2002)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanisme d'action de la rapamycine sur la protéine TOR

Figure 2 : Cascade métabolique de la biosynthèse du cholestérol

Figure 3 : Représentation schématique de la régulation de l'HMG-CoA réductase et ses relations avec la biosynthèse du cholestérol et des acides biliaires

Figure 4 : Modèle d'activation des SREBPs par libération protéolytique induite par les stérols (d'après Goldstein et coll, 2002)

Figure 5 : Structure générale des lipoprotéines

Figure 6 : Métabolisme des lipoprotéines (d'après Kwiterovich, 2000)

Figure 7 : Rôles des cytochromes P450s dans la biosynthèse des acides biliaires chez l'homme

Figure 8 : Mécanisme de rétrocontrôle du catabolisme du cholestérol par les récepteurs nucléaires LXR, FXR et PXR

Figure 9 : Gènes cibles et ligands des récepteurs nucléaires LXR, FXR et PXR

Figure 10 : Schéma du *LightCycler*

Figure 11 : Longueurs d'ondes d'émission et d'excitation du fluorophore SYBR Green I

Figure 12 : Inhibition de l'activité CYP27A1 dans les mitochondries de cellules HepG2 par la CsA et la RAPA

Figure 13 : Effet de la CsA ou de la RAPA en présence de cholestérol (100μM) sur l'expression de l'HMGR par les cellules HepG2

Figure 14 : Effets de la CsA et de la RAPA sur l'activité oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1) dans les microsomes de cellules HepG2

Figure 15 : Effets de la CsA et de la RAPA sur l'activité HMG-CoA réductase dans les microsomes de cellules HepG2

Figure 16 : Effet de la CsA ou de la RAPA en présence de cholestérol (100μM) sur l'expression du LDL-R par les cellules HepG2

Figure 17 : Effet de la CsA ou de la RAPA en présence de cholestérol (100μM) sur l'expression de ABCA1 par les cellules HepG2

Figure 18 : Effet de la CsA et de la RAPA sur la sécrétion de cholestérol par les cellules HepG2

Figure 19 : Effets temps-dépendant de la CsA et de la RAPA (1μM) sur la sécrétion d'apolipoprotéine B par les cellules HepG2

Figure 20 : Effet de la CsA en présence de cholestérol (100μM) sur l'expression de LXRα par les cellules HepG2

Figure 21 : Effet de la RAPA en présence de cholestérol (100μM) sur l'expression de LXRα par les cellules HepG2

Figure 22 : Représentation shématique des lieux d'action de la CsA et de la RAPA ayant pour conséquence une hyperlipidémie

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques et fonctions des apolipoprotéines majeures

Tableau 2 : Augmentation du cholestérol et des triglycérides chez les patients traités par la ciclosporine, le tacrolimus, le sirolimus et l'everolimus.

Tableau 3 : Facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation du promoteur du gène CYP7A1

Tableau 4 : Polymorphismes du CYP7A1 chez l'homme

Tableau 5 : Polymorphismes du CYP27A1 chez l'homme

Tableau 6 : Séquences des amorces et conditions d'amplification par PCR pour *iCycler*

Tableau 7 : Séquences des amorces et conditions d'amplification par PCR pour *LightCycler*

Tableau 9 : Dosage des apolipoprotéines E, CIII, AI et B

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	ATP Binding Cassette
AC	Acide cholique
ACAT	Acyl-CoA cholesterol acyltransferase
ACDC	Acide chénodéoxycholique
Apo	Apolipoprotéine
ARN	Acide ribonucléosique
ATCC	American Type Culture Collection
BARE	Bile acid response element
BSA	Bovin serum albumin
BSEP	Bile salt export protein
CETP	Cholesterol ester transfert protein
CsA	Ciclosporine A ou cyclosporine A
CYP	Cytochrome P450
DMSO	Diméthylsulfoxide
dNTP	Désoxynucléotide tri-phosphate
DO	Densité optique
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetracetic acid
FKBP	Tacrolimus binding protein
FPP	Farnesyl diphosphate
FXR	Farnesoïd X receptor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
HDL	High density lipoprotein
HMGR	Hydroxy methyl glutaryl coenzyme A réductase
HPβCD	Hydroxypropyl β-cyclodextrine
IDL	Intermediate density lipoprotein
LCAT	Lecithin cholesterol acyl transferase
LDH	Lactate deshydrogénase

LDL	Low density lipoprotein
LDL-R	LDL receptor
LP	Lipoprotein
LPL	Lipoprotein lipase
LRP	LDL-like lipoprotein receptor
LXR	Liver X receptor
MβCD	Méthyl B-cyclodextrine
MRP	Multidrug resistance protein
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NAPDH	Nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate
NOS	Nitrite oxyde synthase
OATP	Organic anion transfer protein
pb	Paire de base
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PLTP	Plasma phospholipid transfer protein
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PTS	Peroxisomal targeting sequence
PXR	Pregnane X receptor
RAPA	Rapamycine
RT	Transcription réverse
SHP	Small heterodimer protein
SRBI	Scavenger receptor type B class I
SREBP	Sterol Responsive Binding Protein
SVF	Sérum de vœu fœtal
TRL	Tacrolimus
TC	Cholestérol total
TG	Triglycérides
VLDL	Very low density lipoprotein

Hypothèses & Objectifs

Le succès des greffes d'organes a été rendu possible grâce à l'administration de médicaments immunosuppresseurs permettant la diminution de la réaction immunitaire à l'encontre du greffon afin de diminuer son rejet par le receveur. Néanmoins, la résolution de ces problèmes court terme a conduit à l'émergence de causes plus chroniques de morbidité et de mortalité. Les immunosuppresseurs sont responsables de différents effets secondaires, pouvant conduire au développement de pathologies cardiovasculaires qui sont devenues la cause majeure de décès chez les transplantés. En effet, l'hyperlipidémie observée chez de nombreux patients soumis à un traitement immunosuppresseur peut conduire au développement d'athérosclérose et à la formation d'athéromes. La ciclosporine A (CsA) est l'un des immunosuppresseurs les plus utilisés dans le traitement du rejet de greffe. Le traitement par ce polypeptide cyclique, inhibiteur de calcineurine, est associé à une élévation du taux plasmatique de LDL cholestérol et de triglycérides. La rapamycine (RAPA, sirolimus) dont les propriétés immunosuppressives ont été découvertes plus récemment est responsable d'effets hyperlipémiants similaires bien que son mode d'action soit différent.

A ce jour, il existe peu de travaux sur les mécanismes responsables de ces hyperlipidémies, notamment après traitement par la rapamycine (RAPA), un nouvel immunosuppresseur macrolide de plus en plus utilisé car il n'est pas responsable de toxicité rénale. Dans le cadre de cette thèse, l'objectif est d'étudier les effets hyperlipémiants induits par ces immunosuppresseurs afin d'identifier au moins certains des mécanismes en cause. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes responsables de l'hypercholestérolémie. Notre hypothèse principale est que la RAPA et la CsA sont responsables d'inhibitions enzymatiques ou de dérégulation transcriptionnelle qui conduiraient à l'hyperlipidémie.

Pour ce faire, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux effets des immunosuppresseurs CsA et RAPA sur le métabolisme des acides biliaires. La biosynthèse des acides biliaires est la principale voie de dégradation du cholestérol. Les enzymes à cytochrome P450 sont les enzymes clés de cette voie de biosynthèse ; elles ont été dosées, en particulier le CYP27A1, en présence de CsA ou de RAPA à partir de mitochondries de cellules HepG2. En effet, si l'inhibition de l'activité CYP27A1 par la CsA a été rapportée par

plusieurs équipes, les effets de la RAPA n'ont pas été étudiés sur les enzymes à cytochrome P450 de la biosynthèse des acides biliaires.

Par la suite, l'analyse des effets de ces immunosuppresseurs sur l'homéostasie du cholestérol a été poursuivie par l'étude de la régulation transcriptionnelle de protéines impliquées dans la biosynthèse (HMGR), la dégradation (CYP7A1 et CYP27A1) et le transport (LDL-R, SRBI, ABCA1) du cholestérol à partir du même modèle d'hépatome humain, la lignée cellulaire HepG2. L'étude simultanée de l'expression de ces différentes protéines permettra de compléter le schéma partiel des modifications transcriptionnelles dues à la CsA et de les comparer aux effets de la RAPA. Nous étudierons également l'expression de facteurs de transcription qui sont des récepteurs nucléaires impliqués dans le contrôle de nombreuses protéines impliquées dans l'homéostasie du cholestérol et des acides biliaires. LXR est le récepteur nucléaire des oxystérols qui sont des régulateurs importants de la biosynthèse (HMG-CoA réductase) et de la dégradation (CYP7A1 et CYP27A1) du cholestérol mais également de son transport (LDL-R, ABCA1). FXR est le récepteur des acides biliaires et intervient dans la régulation de sa propre synthèse ainsi que dans le métabolisme des lipoprotéines (apoAI, apoCII). PXR a pour ligand certains xénobiotiques et acides biliaires secondaires. Il active la transcription de gènes cibles impliqués dans l'hydroxylation et l'efflux de ces composés potentiellement toxiques.

Les apolipoprotéines jouent un rôle crucial dans le transport et le métabolisme du cholestérol et des triglycérides. Différentes études cliniques ont mis en évidence des variations des taux plasmatiques de plusieurs apolipoprotéines qui pourraient contribuer à l'augmentation des concentrations de cholestérol et de triglycérides observées chez ces patients. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'apoAI essentiellement retrouvée dans les HDL et impliquée dans le transport inverse du cholestérol, l'apoB100 qui est un ligand du LDL-récepteur et présente surtout dans les LDL, l'apoCIII coinhibiteur de la lipoprotéine lipase responsable de l'hydrolyse des triglycérides et l'apoE qui joue également un rôle de ligand du LDL-récepteur. Nous avons donc étudié les modifications de leur production par le foie qui est l'organe majeur dans le métabolisme des lipoprotéines.

Situation du sujet

I. MODE D'ACTION ET EFFETS INDESIRABLES DES IMMUNOSUPPRESSEURS

I.1. La ciclosporine A

I.1.1. Mode d'action

Depuis son introduction dans les années 1970s, la ciclosporine A (CsA) a pris une part prépondérante dans la thérapie immunosuppressive pour la prévention du rejet de greffes d'organes. La CsA est un cyclopeptide lipophile, composé de 11 acides aminés, isolé à partir du champignon *Typocladium inflamatum.*

Son action inhibitrice est due à sa capacité à inhiber la calcineurine, une sérine-thréonine phosphatase calcium-dépendante dont les effets régulateurs agissent sur de nombreux gènes. Après diffusion à travers la membrane des cellules cibles -les lymphocytes T- la CsA se fixe sur son récepteur, une protéine cytosolique soluble, la cyclophiline (Handschumacher, 1984). Le complexe CsA-cyclophiline agit alors sur la calcineurine pour inhiber son activité enzymatique. Le substrat de la calcineurine *–le facteur nucléaire des cellules T activées-* (Emmel, 1989) ne peut donc plus pénétrer dans le noyau et initier la production autocrine d'IL-2. La prolifération des lymphocytes devient impossible et l'expansion clonale nécessaire à la mise en place de la réaction immunitaire est bloquée (Jain, 1992). La transcription de nombreux autres gènes est modifiée dont celle du récepteur de l'interleukine-2, de la nitrite oxyde synthétase (NOS), du transforming growth factor TGFβ, de l'endotheline-1 et des collagènes I et IV (Almawi and Melemedjian, 2000).

I.1.2. Effets indésirables

Les effets secondaires les plus fréquemment observés sont l'insuffisance rénale aiguë, réversible et dose-dépendante pouvant simuler une crise de rejet chez le transplanté ou une néphrotoxicité chronique avec fibrose interstitielle (Paul, 1998)

En clinique, l'hypertension artérielle est également très souvent observée (40 à 100 % des patients), les augmentations de pression sanguine provenant d'une augmentation des résistances vasculaires périphériques. Les mécanismes complexes de cette vasoconstriction générale provoqueraient dans le rein une diminution de la filtration glomérulaire et de

l'excrétion sodique. D'autres effets secondaires on étés décrits. Des signes modérés de neurotoxicité sont observés chez 10 à 28 % des patients sous forme de tremblements, névralgies ou neuropathies périphériques. Ces symptômes liés au traitement sont réversibles chez la plupart des patients après diminution du dosage. Il a également été observé une hypercholestérolémie chez 2/3 des patients traités par la CsA après un an de traitement (Kahan et coll, 1998 ; Paul, 1998).

I.2. La rapamycine (sirolimus)

I.2.1. Mode d'action

La rapamycine (RAPA) est initialement décrite comme un antibiotique macrolide ayant des propriétés antifongiques et antitumorales. C'est 20 ans plus tard, quand sa similitude structurale avec le tacrolimus (FK506) a été établie, que ses propriétés immunosuppressives ont été étudiées. La RAPA est un immunosuppresseur qui réduit l'activation des lymphocytes T par blocage –*via* une inhibition de la mTOR (mammalian target of rapamycin)- du cycle cellulaire, entre les phases G1 et S (Sehgal et coll, 1995 ; Saunders et coll, 2001)

Tout comme la ciclosporine et le tacrolimus (TRL), la RAPA est un immunosuppresseur qui agit via la fixation à une immunophiline : la CsA avec la cyclophiline, le tacrolimus et la rapamycine avec FKBP (tacrolimus-binding protein). Les complexes CsA-cyclophiline et tacrolimus-FKBP inhibent la calcineurine phosphatase, ce qui empêche la transcription des ARNm de cytokines clés telles que l'IL-2. Le complexe RAPA-FKBP n'inhibe pas la calcineurine ou la transcription d'IL-2 mais prévient la transcription d'ARNm qui codent pour des régulateurs du cycle cellulaire (Morris, 1995). Le complexe RAPA-FKBP se fixe à une kinase appelée mTOR. mTOR joue un rôle central dans la voie de régulation du cycle cellulaire par les facteurs de croissance **(Figure 1).** mTOR (et probablement la phosphatase PP2A) régule la phosphorylation de protéines qui contrôlent la transcription d'ARNm codant pour des régulateurs du cycle cellulaire (4^E-BP1 et p70S6 kinase) (Brunn et coll, 1997). Cette régulation peut être directe ou indirecte car mTOR agit en partie en régulant PP2A.

Ainsi, la RAPA inhibe la réponse des lymphocytes T aux cytokines telles que l'IL-2, et agit également sur les lymphocytes B et les cellules non-immunitaires. En conséquence, la RAPA

interfère avec l'activation des lymphocytes T à un stade ultérieur du cycle cellulaire que le tacrolimus ou la ciclosporine.

La RAPA nécessitant la même protéine intracellulaire de liaison (FKBP) que le tacrolimus, elle pourrait avoir une action antagoniste en condition saturante. L'association de ces deux molécules est donc évitée au profit d'une association ciclosporine et rapamycine très profitable (Kahan et coll, 1998).

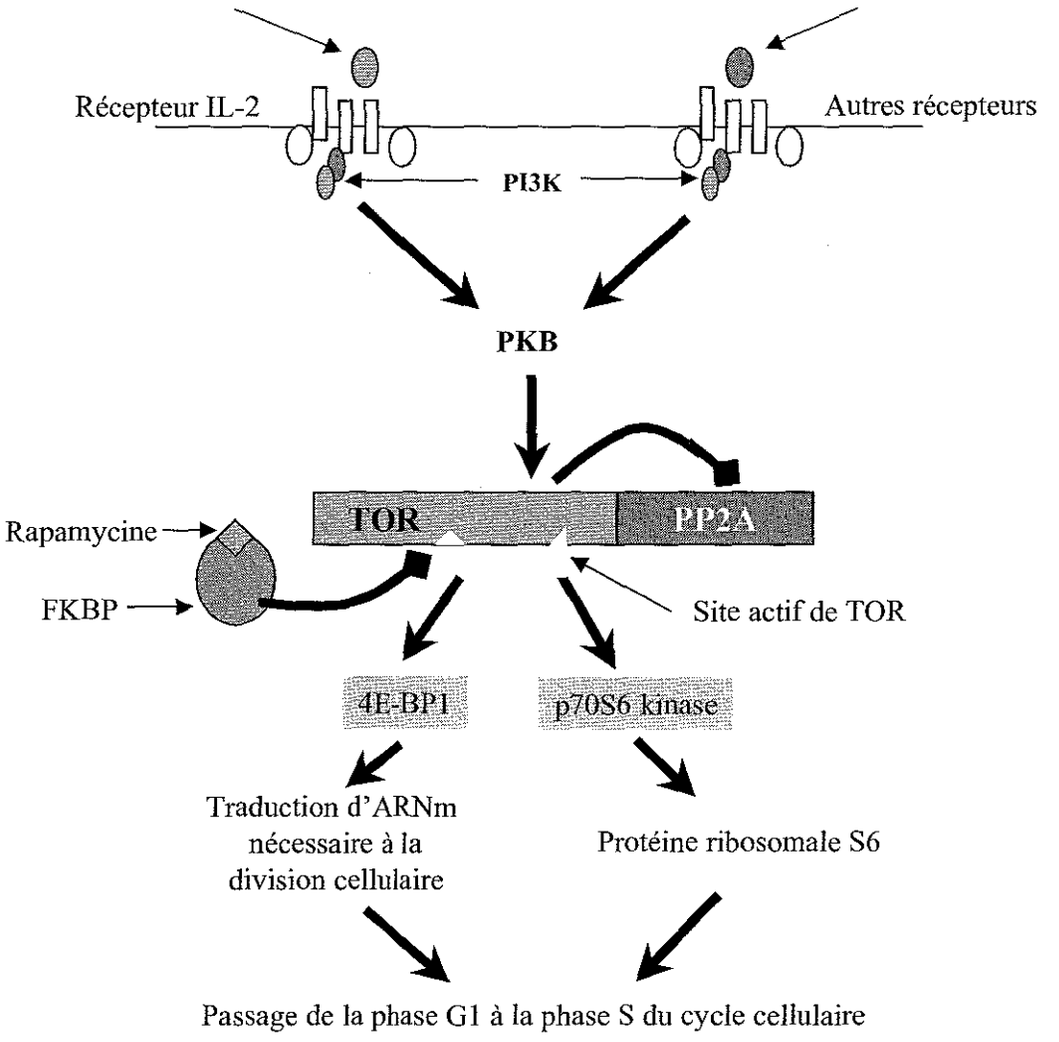


Figure 1 *: Mécanisme d'action de la rapamycine sur la protéine TOR (d'après Halloran, 2000)*

IL-2 : interleukine 2 ; PI3K : Phosphatidyl inositol 3 kinase ; PP2A : protéine kinase B ; PP2A : protéine phosphatase 2A ; TOR : target of rapamycine ; 4E-BP1 : protéine de liaison du facteur d'initiation eukaryote 4F.

I.2.1. Effets indésirables

La RAPA possède un profil de tolérance différent de celui de la CsA, et notamment une moindre néphrotoxicité lorsque cette nouvelle molécule est utilisée en monothérapie. Parmi les effets indésirables spécifiques de la RAPA, sont décrits une myélosuppression avec anémie, thrombopénie et leucopénie ainsi qu'une hyperlipémie associant hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie chez plus de 44% et 51 % des patients respectivement (Morelon et coll, 2001). Les autres effets indésirables sont dus à l'immunosuppression : sensibilité aux infections des voies urinaires en particulier, avec possibilité de pyélonéphrites, risque de lymphomes et de cancers cutanés. Par ailleurs des arthralgies ou de l'acné sont observés.

La CsA et la RAPA agissent par des mécanismes différents et sont responsable d'effets secondaires variables dont certains sont communs à ces deux immunosuppresseurs tel que l'hyperlipidémie.

II. BIOSYNTHESE ET TRANSPORT DU CHOLESTEROL

II.1. Biosynthèse du cholestérol

II.1.1. Généralités

Le cholestérol assure plusieurs fonctions biologiques capitales, il s'agit du précurseur des acides biliaires, des hormones stéroïdes et il participe à la structure des membranes cellulaires. Si les stérols et le cholestérol en particulier sont indispensables à la fonction de la cellule, un excès de cholestérol peut être toxique au niveau cellulaire et conduire à des affections athérosclérotiques. Il est donc particulièrement important de pouvoir contrôler de façon efficace son homéostasie. De nombreuses études épidémiologiques montrent que l'athérosclérose est directement reliée à l'augmentation du cholestérol plasmatique et/ou du taux de LDL-cholestérol circulant.

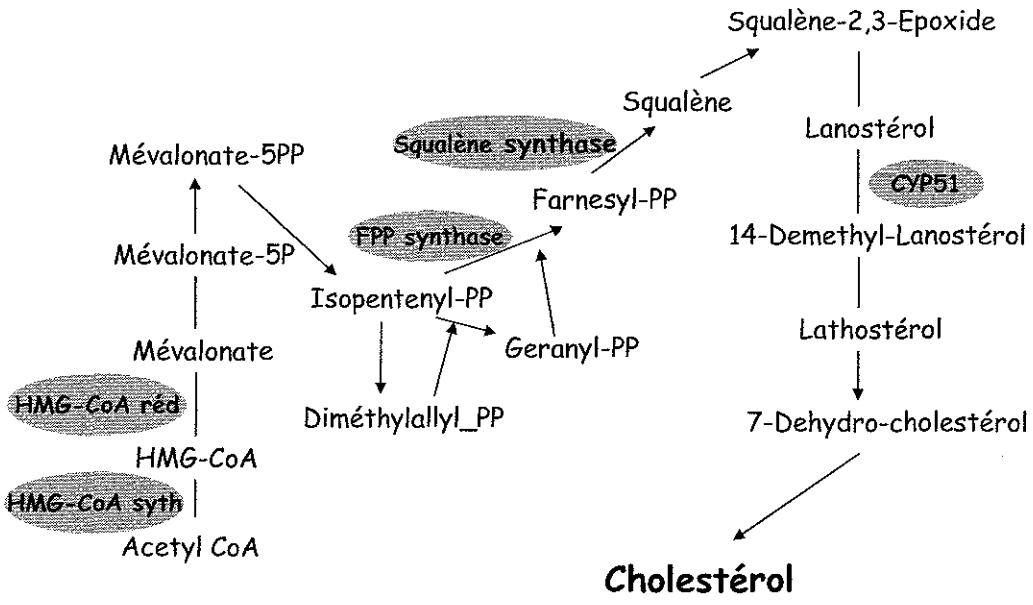


Figure 2 *: Cascade métabolique de biosynthèse du cholestérol*

Le cholestérol de l'organisme provient soit, d'un apport exogène, soit, pour la plus grande part (60 à 90 %), d'une synthèse *de novo* à partir de l'acétate. La synthèse du cholestérol est cytoplasmique et s'effectue dans toutes les cellules de l'organisme mais seul l'intestin et le foie contribuent de façon quantitative au cholestérol circulant. Il existe différentes enzymes importante dans le métabolisme du cholestérol dont la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) synthase, l'HMG-CoA réductase, la farnesyl diphosphate (FPP) synthase, la

squalène synthase et la lanostérol 14α-déméthylase **(Figure 2)**. Cette dernière appartient à la famille CYP51 qui est le membre le plus conservé entre les espèces parmi la superfamille des cytochromes P450. Les gènes codant pour ces différentes enzymes impliquées dans l'homéostasie du cholestérol sont régulés par les oxystérols (Strömsted et coll, 1996).

L'HMG-CoA réductase (HMGR) est l'enzyme clef régulant la synthèse du cholestérol. Il s'agit d'une étape limitante de la synthèse du cholestérol. La diminution de son activité cellulaire par rétrocontrôle négatif permet de réduire la synthèse de cholestérol endogène. Le cholestérol et les phospholipides sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique puis dirigés vers des membranes spécifiques par différents mécanismes ATP dépendant. Le pourcentage de cholestérol cellulaire dans les membranes plasmiques est estimé entre 65 et 85 % (Liscum et Munn, 1999).

II.1.2. Régulation de l'HMG-CoA réductase

L'HMGR est une glycoprotéine de 98 kDa localisée dans le réticulum endoplasmique dont le site actif, situé dans le domaine C-terminal de la protéine, est orienté vers le cytosol (Liscum et coll, 1983). Le domaine membranaire est indispensable à l'activité catalytique et est essentiel à la régulation de la demi-vie de l'enzyme. Son gène est situé sur le bras long du chromosome 5 (5q13.3-q14).

II.1.2.1. Rétrocontrôle de l'HMG-CoA réductase

L'HMGR est régulée par un mécanisme de rétrocontrôle multivalent. La suppression complète de son activité requiert la présence d'au moins 2 régulateurs : 1) le cholestérol ou des stérols qui proviennent normalement de façon exogène des LDL plasmatiques, et 2) un produit non stéroïde qui est normalement synthétisé de façon endogène à partir du mévalonate (Brown et Goldstein, 1980). Ce contrôle métabolique est réalisé à travers des changements de taux de transcription du gène de l'HMGR (Liscum et coll, 1983; Osborne et coll., 1985; Clarke et coll, 1985), une efficacité traductionnelle différentielle ainsi que des variations de la stabilité de l'ARNm (Nakanishi et coll, 1988; Choi et coll. 1995) et au niveau post-tranductionnel par l'altération de la stabilité de la protéine (Faust et coll., 1982; Chin et coll., 1985). Ainsi, lorsque les cellules sont privées de stérols, l'enzyme est stabilisée et sa demi-vie est prolongée, alors que l'abondance des stérols, en particulier de cholestérol, conduit à sa

dégradation rapide. De plus, la phosphorylation de l'HMG-CoA réductase, due à une réductase kinase, rend celle-ci inactive et joue donc un rôle important dans sa régulation.

Lorsque la cellule a accumulé trop de cholestérol, l'excès est converti en esters de cholestérol par l'action de l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT). Du fait de leur capacité à traverser les membranes cellulaires et à s'associer aux lipoprotéines plus rapidement que le cholestérol, la formation des oxystérols est également un mécanisme par lequel les cellules éliminent l'excès de cholestérol. Les oxystérols, intermédiaires de la biosynthèse des acides biliaires sont des régulateurs important de l'HMGR **(Figure 3)** (Axelson et Larsson, 1995). Ce sont des répresseurs plus importants de la biosynthèse du cholestérol que le cholestérol lui-même (Kandutsch et coll, 1978). Ces dérivés du cholestérol sont des molécules de signalisation importantes qui modulent l'activité de nombreux facteurs de transcription afin de limiter l'accumulation excessive de cholestérol. Ainsi des perturbations affectant les enzymes initiatrices du métabolisme des acides biliaires entraînent une augmentation de l'expression de l'HMGR du fait de la diminution du rétrocontrôle par les oxystérols (Repa et coll, 2000, Rudling et coll, 2002). Le métabolisme du cholestérol par la voie des acides biliaires, est une part importante de son élimination. Cette voie est modulée par des récepteurs nucléaires (cf. Revue Regard sur la Biochimie).

De plus, les acides biliaires qui sont les produits finaux de la dégradation du cholestérol sont des répresseurs efficaces de l'HMGR *in vivo* lors des étapes transcriptionnelles et post-transcriptionnelles (Björkhem et coll, 1997).

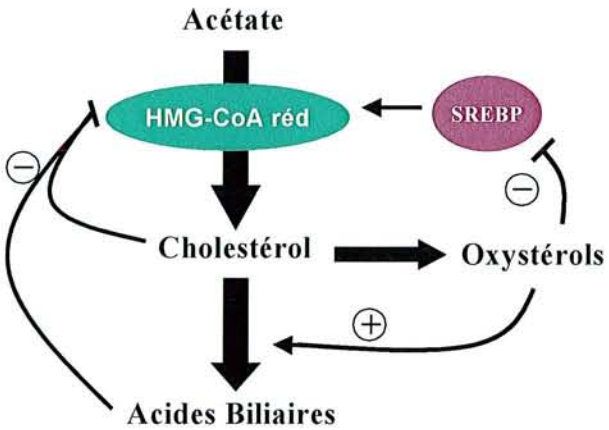


Figure 3 : *Représentation schématique de la régulation de l'HMG-CoA réductase et ses relations avec la biosynthèse du cholestérol et des acides biliaires*

II.1.2.2. Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'HMGR

Le promoteur de l'HMGR contient un élément de réponse-"like" aux oestrogènes (Red -ERE) en position -93, qui est capable de médier une régulation hormonale de l'HMGR (DiCroce et coll, 1999). Par ailleurs, des études de footprinting ont mis en évidence un élément de réponse aux stérols (SRE) et plusieurs sites NF-1 like (nuclear factor 1) dans le promoteur de l'HMGR (Lloyd et Thompson, 1995). Le site SRE permet l'activation du promoteur de l'HMGR par des facteurs de transcription SREBP (sterol responsive binding protein) (Shimano et coll, 1996). En effet, quand les cellules manquent de cholestérol, les protéines SREBP sont clivées de la membrane du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire par protéolyse. Ensuite, le fragment amino-terminal soluble contenant les fonctions de liaison à l'ADN et d'activation transcriptionnelle est transloqué dans le noyau où il active l'expression de gènes cibles (Vallett et coll, 1996, Horton et coll, 2002, **Figure 4**).

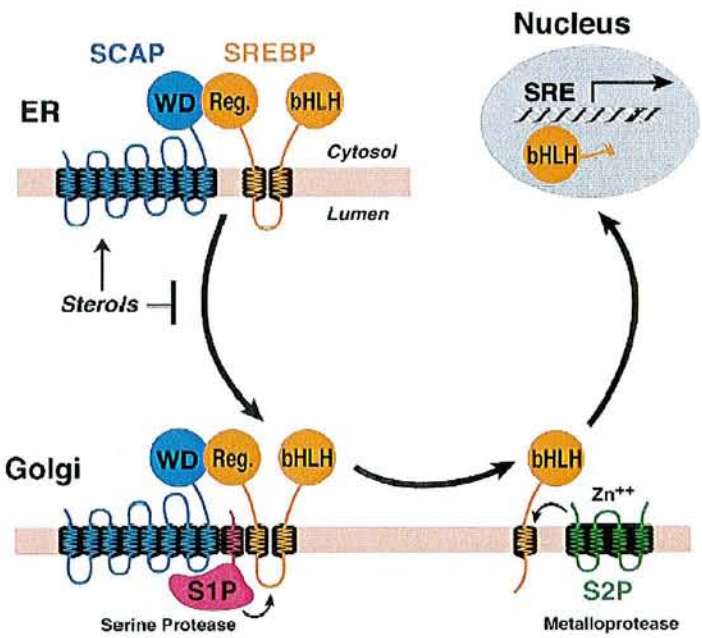


Figure 4 : Modèle d'activation des SREBPs par libération protéolytique induite par les stérols (d'après Goldstein et coll, 2002)

Quand les cellules sont dépourvues de cholestérol, SCAP (SREBP cleavage-activating protein) -un transporteur de SREBP et un détecteur de stérols- transporte SREBPs du réticulum endoplasmique vers l'apparail de Golgi. A ce moment deux protéases, Site-1 protéase (S1P) et Site-2 protéase (S2P), agissent de façon séquentielle pour libérer le domaine N-terminal (bHLH) de la membrane. Puis ce fragment entre dans le noyau et se fixe à un SRE au niveau du promoteur de gènes cibles et active leurs transcriptions. Quand le cholestérol augmente, le complexe SCAP/SREBP n'est plus incorporé dans les vésicules du réticulum endoplasmique, les SREBPs n'atteignent plus l'appareil de Golgi et le domaine bHLH-Zip ne peut être libéré de la membrane. Ainsi la transcription des gènes cibles diminue.

En dehors des séquences consensus identifiées permettant la fixation de facteurs de transcription, l'activité de cette enzyme est diminuée par l'oxydation (Ness et coll, 1985) et notamment par le peroxyde d'hydrogène. L'H_2O_2 agirait directement au niveau de HMGR et entraînerait la formation de ponts disulfure qui inactivent l'enzyme (Omkumar et Ramsarma, 1993).

II.2. Transport du cholestérol

Dans la lymphe et le plasma, le cholestérol est transporté sous forme de lipoprotéines, édifices plurimoléculaires de lipides et de protéines associées par des liaisons de faible énergie. Les lipoprotéines plasmatiques sont synthétisées dans le foie, l'intestin ou formées dans le plasma par la transformation d'autres lipoprotéines (Chapman 1982, Eisenberg 1980). Les lipoprotéines plasmatiques sont généralement classées en fonction de leur densité hydratée en chylomicrons, lipoprotéines de très basse densité (VLDL), de basse densité (LDL), de densité intermédiaire (IDL) et de haute densité (HDL) chez l'homme. Ce sont généralement les LDL et les HDL qui renferment les plus grandes proportions de cholestérol estérifié. Au moins 12 apolipoprotéines (apo) différentes ont été identifiées dans les lipoprotéines. Chacune d'entre elle joue un rôle spécifique.

II.2.1. Les lipoprotéines

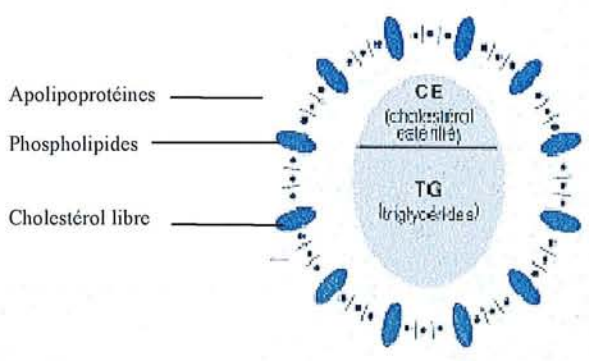


Figure 5 *: Structure générale des lipoprotéines*

Les lipides, à l'exclusion des acides gras libres, ne peuvent circuler à l'état libre dans le plasma.. Ils sont donc transportés dans des macromolécules spécialisées, les lipoprotéines (LP). Ces LP de forme sphérique, comportent une partie centrale composée par les lipides hydrophobes (cholestérol estérifié et triglycérides), une partie périphérique composée par les

lipides hydrophiles (cholestérol non estérifié, phospholipides) et de la partie protéique des LP les apolipoprotéines ou apoprotéines (**Figure 5**).

II.2.1.1. Les chylomicrons

Les chylomicrons sont les transporteurs principaux (avec les VLDL) des triglycérides d'origine alimentaire. Ils véhiculent également le cholestérol alimentaire venant d'être absorbé dans la lymphe et le plasma.. Au cours de leur passage dans le sang, ils reçoivent certains peptides ainsi que du cholestérol libre et estérifié. Puis ils subissent l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) qui hydrolyse leurs triglycérides avec pour cofacteur l'apo CII, apporté par le substrat lui-même (chylomicrons et VLDL). Ce processus tend à réduire leur taille et provoque le transfert de certains de leurs constituants de surface (phospholipides, cholestérol libre, apoCII et apoAIV) vers les HDL. La particule résiduelle appelée « remnants », enrichie en apoE est alors captée par le foie par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques apoB/E ou LDL récepteur **(Figure 6).**

II.2.1.2. Les VLDL

Les VLDL transportent les triglycérides d'origine endogène (hépatique). Elles sont secrétées par le foie et l'intestin (Chapman, 1982). Le métabolisme des VLDL s'apparente à celui des chylomicrons. A un certain stade de leur dégradation par la LPL, les particules résiduelles, enrichies en apoB, sont captées par le foie à l'instar des « remnants » des chylomicrons. Les IDL sont ces formes intermédiaires riches en apoB et E. Elles sont peu catabolisées par les tissus, sauf dans certaines hyperlipoprotéinémies familiales et sont plutôt converties en LDL au niveau du foie sous l'action de la lipase hépatique.

II.2.1.3. Les LDL

Elles représentent chez l'homme la principale voie de transport plasmatique du cholestérol (75% du cholestérol total) et peuvent être considérées, du moins sur le plan de leur composition, comme les ultimes produits de dégradation des VLDL. Deux facteurs peuvent déterminer la concentration de LDL circulantes, la synthèse d'apoB et la vitesse de catabolisme des IDL. Le renouvellement des LDL correspond à 10 à 15 mg d'apoB/jour/kg de poids corporel, soit environ 1 à 1,5 g de cholestérol par jour pour l'organisme entier (Myant, 1982).

Le taux de LDL est associé à l'incidence des maladies cardio-vasculaires, par conséquent, le catabolisme des LDL a largement été étudié. La fixation des LDL sur les récepteurs dépend de la reconnaissance de l'apo B par les récepteurs **(Figure 6)**. Quand ceux-ci sont bloqués ou altérés (méthylation oxydative, acétylation, ...) la captation des LDL est complètement supprimée.

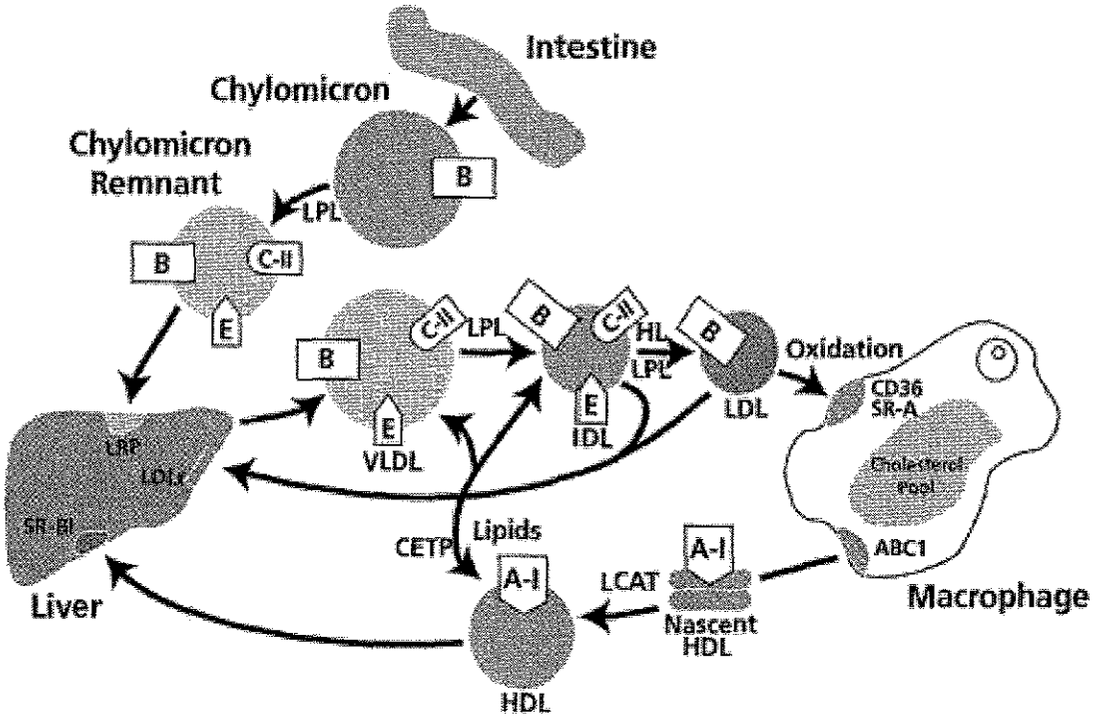


***Figure 6**: Métabolisme des lipoprotéines (d'après Kwiterovich, 2000)*

Le cholestérol et les triglycérides alimentaires venant d'être absorbés sont secrétés par les cellules intestinales sous forme de chylomicrons, un processus dépendant de l'apoB (B). Les triglycérides (TG) des chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) à l'aide de l'apoCII qui sert de cofacteur, aboutissant à la formation de remnants de chylomicrons captés par le LRP (LDL-like receptor protein) dans le foie. Les VLDL sont sécrétées par le foie, et les triglycérides au cœur des VLDL sont hydrolysés par la LPL et l'apoCII pour former des IDL. Le foie *via* l'interaction de l'apoE avec le récepteur des LDL (LDL-R) capture une partie des IDL ; l'autre partie est hydrolysée par la lipase hépatique (HL) pour former des LDL. Si les LDL sont oxydés, elles pourront être captées par les macrophages. Les HDL naissantes sont formées dans le foie et l'intestin. Elles sont sécrétées en particules lipoprotéiques contenant essentiellement des phospholipides et de l'apoAI. Les HDL naissantes interagissent avec les tissus périphériques tels que les macrophages, et transfèrent le cholestérol par l'intermédiaire des transporteurs ABCA1. Le cholestérol des HDL naissant est alors estérifié en acide gras par l'action de la lecithin cholesterol acyl tranferase (LCAT) et son coactivateur, l'apoAI, produisant des HDL matures. Le cholestérol estérifié dans le cœur des HDL est alors rapporté au foie, soit par l'interaction des HDL avec le récepteur SRBI, ou transféré aux lipoprotéines contenant l'apoB par la CETP (cholesteryl ester tranfert protein).

II.2.1.4. Les HDL

Les HDL sont un groupe hétérogène de lipoprotéines de petite taille parmi lesquelles on distingue, selon leur composition et leur densité, les HDL_1, les HDL_2 et les HDL_3. Les HDL_1 de densité plus faible, se caractérisent par leur richesse en apolipoprotéine E et en cholestérol. Les particules naissantes d'origine hépatique sont principalement constituées d'apolipoprotéines AI et de peu de cholestérol. Leur rôle est donc de capter le cholestérol des cellules **(Figure 6)**.

Les HDL jouent un rôle critique dans le métabolisme du cholestérol (Eisenberg et coll., 1984 ; Tall et coll., 1990) et leur concentration plasmatique est inversement corrélée avec le risque d'athérosclérose (Gordon et coll., 1989). Le transport du cholestérol, via les HDL, des tissus extra-hépatiques vers le foie, appelé transport inverse du cholestérol (Yokoyama, 1998) joue un rôle majeur dans l'homéostasie du cholestérol et peut expliquer une partie des effets protecteurs des HDL contre l'athérosclérose (Tall et coll., 1990). Deux mécanismes indépendants sont impliqués : l'un concerne la libération du cholestérol localisé dans les membranes plasmiques vers la phase aqueuse suivie d'une diffusion jusqu'à absorption par une particule lipoprotéique acceptrice comme les HDL (Johnson et coll., 1991) ; l'autre mécanisme d'efflux du cholestérol est médié par les apolipoprotéines : quand les HDL interagissent avec des sites spécifiques sur la surface cellulaire, la translocation du cholestérol intracellulaire vers la membrane plasmique est induite (Oram et coll., 1991).

II.2.2. Les apolipoprotéines dans le transport du cholestérol

Comme nous l'avons vu, ces apolipoprotéines ont un rôle structural important. Elles se situent à la surface des lipoprotéines grâce à leurs acides aminés hydrophiles. La partie hydrophobe de ces protéines est tournée vers l'intérieur. Ces apoprotéines ont une deuxième fonction : certaines jouent le rôle de ligand, d'autres d'activateurs ou d'inhibiteurs enzymatiques **(Tableau 1)**.

Il existe cinq classes d'apolipoprotéines majeures : A, B, C, D, E avec des sous classes. Il faut retenir surtout que :

- L'apoAI, présente surtout dans les HDL, est en corrélation positive avec le cholestérol HDL, c'est-à-dire la fraction anti-athérogène du cholestérol total. Elle active la LCAT (lecithine cholesterol acyltransferase) impliqué dans le transport inverse du cholestérol (**Figure 6**).
- L'apoB, constituant protéique majeur des LDL, est en corrélation positive avec le cholestérol LDL, c'est-à-dire la fraction athérogène du cholestérol total. C'est un ligand des LDL-R ou encore appelé récepteurs B,E (Brown et Goldstein, 1986)
- L'apoCII et l'apoCIII sont les cofacteurs d'activation et d'inhibition de la lipoprotéine lipase responsable de l'hydrolyse des triglycérides. On les retrouve dans les VLDL et les HDL.
- L'apoE présente surtout dans les VLDL des LDL et des chylomicrons permet leur captation par les récepteurs des LDLR

Tableau 1 *: Caractéristiques physico-chimiques et fonctions des apolipoprotéines majeures*

Apo	AA	PM (kDa)	Synthèse	VLDL	LDL	HDL	Concentration plasmatique (g/l)	Fonction
AI	245	23.3	foie, intestin	4%		67%	1.0 à 1.2	Activateur LCAT, efflux de cholestérol
AII	77 x 2	17	Foie, intestin			22%	0.4	Structure des HDL
AIV	396	45	Intestin			+	0.15	Efflux de choletérol
B100	4535	540	Foie	35%	90%		0.7 à 1.0	Sécrétion des VLDL, ligand du LDL-R
B48	2130	275	Intestin				0.03 à 0.05	Sécrétion des chylomicrons
CI	57	7	Foie	+		+	0.04 à 0.06	Activateur LCAT in vitro
CII	78	8.9	Foie	40%		5-9%	0.03 à 0.05	Activateur LPL
CIII	79	8.7	Foie	+		+	0.12 à 0.14	Inhibiteur LPL
E	299	38	Foie, intestin, surrénales, macrophages	13%	+		0.03 à 0.05	Ligand LDL-R

II.3. Les récepteurs des lipoprotéines

II.3.1. Le récepteur des LDL

Le gène du LDL- récepteur (LDL-R) humain (48 kb) comprend 18 exons et est localisé sur le chromosome 19. Des études de génétique moléculaire chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, ont permis d'identifier plus de 600 mutations différentes dans ce gène qui peuvent être regroupées en 5 catégories en fonction de leur effet sur les protéines (Hobbs et coll., 1990) :

Catégorie 1 : allèle nul – pas de précurseur détectable. Ces allèles mutants ne produisent pas de protéines réceptrices et donc ne lient aucunes particules LDL.

Catégorie 2 : faible ou absence de transport du précurseur. On observe une absence de transport du réticulum endoplasmique vers les compartiments golgiens et les récepteurs n'atteignent pas la surface cellulaire.

Catégorie 3 : défaut de fixation du ligand. Ces récepteurs sont incapables de fixer efficacement les LDL du fait de subtils changements structuraux proches du domaine de fixation du ligand.

Catégorie 4 : défaut d'internalisation. Les mutations touchent directement ou indirectement le domaine carboxy-terminal dont fait partie le domaine de fixation au ligand.

Catégorie 5 : défaut de recyclage. Ce récepteur tronqué lie et internalise les ligands, mais ne les relargue pas dans l'environnement acide de l'endosome.

La forme mature du LDL-R est une glycoprotéine membranaire de 160 kDa comprenant 5 domaines. Le domaine ligand permet la fixation de lipoprotéines contenant l'apoB100 et/ou l'apoE (Esser et coll., 1988). Depuis les études classiques du LDL-R entre 1974 et 1984, d'autres protéines membranaires ayant une structure homologue ont été découvertes : ces protéines forment la famille des LDL-R.

Le LDL-R est le composant le plus important dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol (Brown et Goldstein, 1986). Il est sujet à de nombreuses régulations du fait de son rôle d'interface entre les *pools* de cholestérol extra- et intracellulaire. *In vivo*, le LDL-R a deux fonctions importantes : fournir le cholestérol aux cellules et soustraire les lipoprotéines riches en cholestérol afin de prévenir leur accumulation dans la circulation. Ces concepts sont venus d'études sur les fibroblastes en culture, de sujets sains et de sujets atteints par une

hypercholestérolémie familiale. L'absence de LDL-R conduit à ce phénotype anormal, il s'ensuit une accélération du développement de l'athérosclérose et ses complications. (Nimpf et Schneider, 2000).

Les dérivés des LDL-cholestérol et leurs produits d'oxydation engendrent une série complexe de rétro-contrôles qui protègent les cellules de la suraccumulation de cholestérol. Les dérivés des LDL-stérols inhibent les activités HMGR et HMG-CoA synthase, deux enzymes clés dans la biosynthèse du cholestérol. De plus, le cholestérol contenu dans les LDL inhibe la synthèse de nouveaux LDL-R empêchant davantage l'entrée des LDL et du cholestérol liés à ces lipoprotéines. La transcription du LDL-R est régulée par les stérols qui agissent via l'élément de réponse SRE-1 (sterol responsive element) qui sont la cible des facteurs de transcriptions SREBP (SRE binding protein). Les oxystérols jouent un rôle important dans la synthèse du cholestérol par leur capacité à réguler l'HMGR mais également l'expression du LDL-R (Goldstein et Brown, 1990). Par ailleurs il existe également une corrélation entre métabolisme des acides biliaires et LDL-R du fait de son contrôle négatif par certains de ces oxystérols intermédiaires de la biosynthèse des acides biliaires (Rudling et coll., 2002).

II.3.2. Le récepteur des HDL

SR-BI (Scavenger Receptor Class B Type I) est le récepteur cellulaire membranaire des HDL qui reconnaît les apolipoprotéines sur la surface des particules HDL incluant leur composant majeur, l'apoAI (Rigotti et coll., 1997). Le taux de SR-BI est altéré par des mutations de l'apoAI et de la LCAT (Wang et coll., 1996 ; Francone et coll., 1997) impliqué dans l'estérification et l'incorporation du cholestérol dans les HDL **(Figure 5).**

In vivo, SR-BI est fortement exprimé dans le foie et les tissus stéroïdogènes qui sont les tissus les plus activement engagés dans la capture lipidique des HDL (Rigotti et coll., 1997) mais aussi dans l'intestin, le tissu adipeux et les poumons. SR-BI est une protéine trans-membranaire de 509 acides aminés détectable à la surface de l'hépatocyte, au niveau des sinusoïdes et des canalicules biliaires. Le gène de SR-BI est localisé sur le chromosome 12. L'analyse de la séquence de SR-BI a mis en évidence dans la partie intra-cytoplasmique une séquence de ciblage peroxysomale PTS1 (peroxisomal targeting sequence). PTS1 est reconnue par un récepteur spécifique qui dirige les protéines contenant cette séquence dans les

peroxysomes, un des sièges de la β-oxydation des acides gras et du cholestérol, cela suggère que SR-B1 joue un rôle dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires (Combettes-Souverain et coll., 1999). L'épissage alternatif de l'ARNm précurseur de SR-BI peut aboutir à une isoforme SR-BII chez la souris et chez l'homme (Webb et coll., 1997). SR-BI et SR-BII lient les HDL avec la même affinité ; cependant, SR-BII transfère les lipides avec une efficacité 4 fois moins importante que SR-BI (Webb et coll., 1998). SR-BII ne possède pas de séquence de ciblage PTS1.

Différentes études ont mis en évidence l'importance de SR-BI dans le métabolisme des HDL (Rothblat et coll., 1999). Ainsi SR-BI favoriserait non seulement la recapture du HDL-cholestérol (transport inverse du cholestérol) mais également l'efflux cellulaire de cholestérol libre par l'intermédiaire des HDL (Ji et coll., 1997). Chez des souris dont le gène codant pour SR-BI est invalidé, on observe une augmentation de la cholestérolémie de 30 % chez les hétérozygotes et de 125 % chez les homozygotes (Rigotti et coll., 1997).

Il existe un troisième récepteur de lipoprotéine dan le foie, le LRP (LDL-like-lipoprotein receptor) qui permet la capture par le foie des remnants de chylomicrons provenant de l'alimentation (**Figure 6**).

II.4. Le transporteur ABCA1

II.4.1. Généralités

La superfamille de transporteurs ABC regroupe de protéines trans-membranaires permettant le transport de divers substrats : MDR1 et MRP2 impliqués dans l'excrétion hépatique des xénobiotiques toxiques et des acides biliaires, ABCA1 qui joue un rôle essentiel dans l'efflux de cholestérol et des phospholipides et la formation de HDL. Des données récentes (Brooks-Wilson et coll., 1999 ; Rust et coll., 1999) ont mis en avant la contribution des transporteurs ABC dans le transport lipidique du fait du lien établi entre ABCA1 et athérosclérose (Young et coll., 1999).

L'expression de ABCA1 est tissu-spécifique : l'expression la plus forte a lieu dans le placenta, le foie, l'intestin, les surrénales et différents tissus fœtaux. Le gène ABCA1 contient

50 exons et est localisé sur le chromosome 9 (9q22-q31). La transcription de la séquence codante de 6700 pb puis sa traduction aboutit à une glycoprotéine transporteuse (ATP dépendante) de 2200 acides aminés situés dans la membrane plasmique et qui est impliquée dans l'efflux cellulaire de cholestérol non estérifié (Langman et coll., 1999). ABCA1 médie l'efflux de phospholipides et de cholestérol des cellules par l'intermédiaire des apolipoprotéines dont l'apoAI suggérant une interaction directe avec l'efflux de lipides (Wang et coll., 2000).

ABCA1 joue un rôle essentiel dans le métabolisme des lipoprotéines et la biogenèse des HDL. Il a également d'autres fonctions importantes telles que la régulation de l'absorption de cholestérol (McNeish et coll., 2000). L'expression de ABCA1 dans les monocytes/macrophages est stérol dépendante, l'accumulation de cholestérol cellulaire augmente la quantité d'ARNm et de protéine ABCA1 (Lawn et coll., 1999).

II.4.2. Régulation de ABCA1

Le promoteur de ABCA1 possède de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription jouant un rôle dans le métabolisme des lipides. Récemment une série d'expérimentation visant à étudier l'effet des récepteurs RXR sur l'équilibre du cholestérol à mis en évidence leur rôle dans la régulation de ABCA1 (Repa et coll., 2000). Des études avec des agonistes spécifiques des récepteurs ont révélé que les récepteurs des oxystérols (LXRs) forment des hétérodimères avec RXR qui régulent l'expression du transporteur ABCA1 (Costet et coll., 2000). Ces hétérodimères RXR servent de régulateurs clés dans l'homéostasie du cholestérol en gouvernant le transport inverse du cholestérol à partir des tissus périphériques, la biosynthèse des acides biliaires, et l'absorption du cholestérol dans l'intestin. L'activation de l'hétérodimère RXR/LXR inhibe l'absorption de cholestérol en stimulant l'expression de ABCA1 dans l'intestin. L'activation de voie de signalisation aboutit à l'augmentation de ABCA1 dans les tissus périphériques, dont les macrophages, permettant l'efflux de cholestérol libre et le transport inverse vers le foie grâce aux HDL ou il sera converti en acides biliaires.

II.4.3. Pathologies associées à ABCA1

Les mutations du gène ABCA1 chez l'Homme impliquent une déficience familiale en HDL, alors que l'absence complète de l'ABCA1 fonctionnel engendre la maladie de Tangier dans laquelle les HDL sont quasiment absentes du fait de la rapide dégradation de leurs précurseurs (Brooks et Wilson, 1999).

L'IFNγ qui est une cytokine pro-athérogénique diminue l'expression de ABCA1, ce qui relie les aspects inflammatoires de l'athérosclérose à l'efflux de cholestérol (Tall et coll., 2002). Des souris déficientes en Abc1 ont une absorption de cholestérol intestinale plus élevée. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle l'induction de ABCA1 aboutit à une inhibition de l'absorption de cholestérol. Ces souris Abc-1 déficientes sont hypocholestérolémiques et ont une absence quasi complète de HDL. Cette déficience peut s'expliquer par la diminution de plus de 99 % du HDL-cholestérol et de l'apoAI. Par contre, les triglycérides plasmatiques et le taux d'apoB sont essentiellement inchangés (McNeish et coll., 2000).

L'homéostasie du cholestérol dépend non seulement de sa synthèse dont l'HMGR est une enzyme importante car limitante mais également de son transport par les lipoprotéines. Les récepteurs de lipoprotéines avec la participation de différentes apolipoprotéines jouent un rôle primordial dans la régulation de la concentration plasmatique de cholestérol.

MECANISMES DES HYPERLIPIDEMIES DUES AUX IMMUNOSUPPRESSEURS

Dyslipidemia and its management after immunosuppressive treatment

Yann GUEGUEN, Luc FERRARI, Anne-Marie BATT

INSERM U525, Université Henri Poincaré - Nancy 1, 30 Rue Lionnois, 54000 Nancy, France

Soumis à Thérapie

Auteur pour correspondance:

Anne-Marie.BATT

INSERM U525 (Equipe 4)

Université Henri Poincaré, NANCY 1

30, rue Lionnois, 54 000 Nancy, FRANCE

Tel : 33 (0)3 83 68 21 58

Fax : 33 (0)3 83 32 13 22

E-mail : Anne-Marie.Batt@pharma.uhp-nancy.fr

Abréviations : AC : acide cholique, ACDC : acide chénodéoxycholique, Apo : apolipoprotéine, CsA : Ciclosporine A, CYP : cytochrome P450, SRBI : récepteur scavenger BI, LDL-R : récepteur des LDL, RAPA : rapamycine, LPL : lipoprotéine lipase

Résumé

Cet article résume les mécanismes responsables des hyperlipidémies observées après un traitement immunosuppresseur. De nombreux progrès ont été accomplis dans le traitement des patients greffés ces dernières années, notamment de part l'utilisation de nouveaux immunosuppresseurs qui ont permis de s'affranchir de la néphrotoxicité. Toutefois, il persiste une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie importantes chez de nombreux patients qui sont ainsi susceptibles de développer des maladies cardiovasculaires. Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux effets des immunosuppresseurs sur la biosynthèse des acides biliaires qui est la voie principale de dégradation du cholestérol. En effet, l'inhibition de cette voie de biosynthèse et notamment de certains P450 clés dont le CYP27A1 pourrait contribuer à l'augmentation de la cholestérolémie. Les immunosuppresseurs seraient également responsables de modifications de l'activité de certains récepteurs de lipoprotéines (LDL récepteur) ou de la sécrétion de différentes apolipoprotéines impliquées dans le transport du cholestérol et des triglycérides par les lipoprotéines. Enfin, l'hypertriglycéridémie plus fréquemment observée après certains traitements immunosuppresseurs serait en partie causée par des modifications de la synthèse et de la dégradation des triglycérides impliquant la lipoprotéine lipase ou certaines apolipoprotéines qui servent de corépresseur (apoCIII) ou de coactivateur (apoCII) de l'hydrolyse des triglycérides.

Mots clés : Immunosuppresseurs, hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie, acides biliaires, apolipoprotéines.

Abstract

This article summarizes the mechanisms responsible for the hyperlipidemia observed following immunosuppressive treatment. Much progress has been achieved in the treatment of organ transplantation over last ten years, in particular because of the use of new immunosuppressive drugs with less nephrotoxicity. However, hypercholesterolemia and a hypertriglyceridemia persist among many patients who are thus more prove to develop cardiovascular diseases. We first reviewed the effects of immunosuppressive drugs on biliary acid biosynthesis, which is the main pathway of cholesterol degradation. The inhibition of this biosynthesis pathway and especially of some key P450s such as CYP27A1 could contribute to the increased cholesterolemia. Immunosuppressive drugs may also modify the activity of lipoprotein receptors or of the secretion of different apolipoproteins involved in cholesterol and triglyceride transport by lipoproteins. Finally, the fact that hypertriglycéridemia is more frequently observed after certain immunosuppressive treatment may be partly caused by changes in the synthesis and elimination of triglycerides implying lipoprotein lipase some apolipoproteines, used as corepressor (apoCIII) or coactivator (apoCII) of triglyceride hydrolysis.

Keywords : Immunosuppressive drugs, hypercholesterolemia, hyperytriglyceridemia, bile acid, apolipoproteins.

Les pathologies cardiovasculaires sont devenues la principale cause de morbidité chez les patients ayant bénéficié de transplantation d'organes. Ces patients présentent fréquemment une hyperlipémie post-transplantatoire caractérisée par une élévation persistante du cholestérol total, du LDL-cholestérol et des triglycérides, et une diminution du HDL-cholestérol.

1. Effets hyperlipémiants des immunosuppresseurs

Les causes de l'hyperlipémie chez les patients greffés sont probablement multifactorielles, tenant au comportement alimentaire, à des causes génétiques mais probablement aussi aux effets indésirables du traitement immunosuppresseur par les inhibiteurs de calcineurine (cyclosporine, tacrolimus) ou les macrolides apparentés aux rapamycines (rapamycine, everolimus).
La prévalence de ces anomalies varie selon l'étude et l'immunosuppresseur. Une hypertriglycéridémie est observée dans au moins 50 % des cas et une hypercholestérolémie dans au moins 20-30 % des cas.

La ciclosporine (CsA) administrée seule à des sujets qui n'ont pas reçu de transplantation est capable d'augmenter la cholestérolémie totale et le LDL-cholestérol, ce qui va dans le sens d'une propriété de la molécule elle-même (Ballantyne et coll, 1989).

Dans une étude plus récente comparant le tacrolimus (TRL) à la CsA (Ishamaru et coll., 2001) il a été observé une augmentation significative des lipides sériques, un mois après transplantation dans les deux groupes traités soit par la ciclosporine, soit par le tacrolimus alors que plusieurs auteurs accordaient précédemment un avantage au TRL jugé moins hyperlipémiant (McCune et coll., 1998 ; Taylor et coll., 2001, Boots et coll., 2001).

Plusieurs études, dont le Rapport Européen Public d'Evaluation de la RAPA (CPMB/4206/00, 2001 ; Saunders et coll., 2001 ; Blum 2002) mentionnent, après traitement, des concentrations sériques de cholestérol et de triglycérides qui sont maximales 2-3 mois après la transplantation et diminuent progressivement ensuite. L'effet est particulièrement marqué pour les patients chez qui préexiste une hyperlipémie, ce qui souligne un possible facteur

génétique (Hoogeven et coll., 2001). L'association RAPA et CsA majore la tendance à l'hyperlipémie (Kahan et coll., 1998) alors que l'association au TRL serait moins péjorative (McAlister et coll., 2000).

Après traitement par l'éverolimus, l'incidence de l'hypercholestérolémie supérieure à 6,5 mM est de 76 à 87 % des patients traités et celle de l'hypertriglycéridémie supérieure à 2,9 mM est de 59 à 77 % des patients traités, selon la dose d'everolimus administrée (Kovarik et coll., 2002).

Tableau 1 *: Augmentation moyenne du cholestérol total et des triglycérides (exprimée en pourcentage) chez les patients traités par la ciclosporine, le tacrolimus, la rapamycine et l'everolimus.*

Immunosuppresseurs	Cholestérol total	Triglycérides	Références
Ciclosporine	15-20 %	15-20 %	Kasiske1991
	30 %	69 %	Ichamaru 2001
Tacrolimus	16 %	44 %	Taylor 2001
Rapamycine	32 %	28 %	EPAR, CPMB 2001
	50 %	95 %	Morrisset 2002
Everolimus	60 %	100 %	Kovarick 2002

Si le développement de nouveaux immunosuppresseurs a permis de s'affranchir de la néphrotoxicité, l'hyperlipémie persiste comme un effet indésirable commun à ces différentes molécules avec des pourcentages d'augmentation des lipides qui sont de même ordre **(Tableau 1)**. Cet effet peut être maîtrisé par un traitement hypolipémiant et par des mesures diététiques appropriées et parfois par l'interruption du traitement associé (corticoïdes). Bien qu'il n'y ait pas encore de consensus sur la conduite à tenir à l'égard de ces hyperlipémies induites, la tendance est de les traiter par la fluvastatine ou la pravastatine qui n'entrent pas en concurrence avec les voies métaboliques sollicitées par les inhibiteurs de calcineurine. Si l'hypertriglycéridémie est prédominante c'est l'atorvastatine qui est préférée.

La connaissance des mécanismes de ces hyperlipémies est encore fragmentaire pourtant elle pourrait peut-être contribuer à limiter cet effet lors de la recherche et du développement de nouvelles molécules. C'est pourquoi, nous examinons dans cette revue les mécanismes du

catabolisme du cholestérol et du transport des triglycérides susceptibles d'être perturbés par les immunosuppresseurs.

2. Catabolisme du cholestérol

Cette voie métabolique est différente selon les espèces, nous détaillerons uniquement le métabolisme chez l'homme (ou le hamster) mais pas chez les modèles murins. La dégradation du cholestérol par la biosynthèse des acides biliaires permet l'élimination d'une grande partie du cholestérol ingéré quotidiennement. Elle a lieu *via* 2 voies majeures : la voie classique (ou neutre) initiée et principalement régulée par la cholestérol 7α-hydroxylase (CYP7A1) et la voie alternative (ou acide) initiée par la stérol 27-hydroxylase (CYP 27A1) (pour revue voir Souidi et coll., 2001). Les CYP7B1 (oxystérol 7α-hydroxylase) et CYP8B1 (stérol 12α-hydroxylase) jouent également un rôle important dans la transformation du cholestérol en acides biliaires qui met en jeu de nombreuses autres enzymes hépatocytaires (Princen et coll., 1997). Les acides biliaires primaires ainsi formés sont l'acide cholique hydrophile (AC) et l'acide chénodésoxycholique hydrophobe (ACDC).

2.1. La voie neutre (ou classique)

2.1.1. La cholestérol 7α-hydroxylase (CYP7A1)

La cholestérol 7α-hydroxylase a été détectée uniquement dans le foie ; elle est spécifique de la 7α-hydroxylation du cholestérol. Il existe 7 polymorphismes identifiés, et certains sont directement associés au taux de LDL-cholestérol (Cohen et coll., 1992). La pathologie la plus connue qui serait associée à une diminution de l'activité CYP7A1, est la lithiase biliaire cholestérolique qui résulte d'un taux élevé de cholestérol, qui précipite et forme des calculs dans la vésicule biliaire (Erlinger, 1994). La déficience en cyp7a1 chez la souris entraîne une diminution du métabolisme biliaire, lipidique et vitaminique (vitamines D et E). La supplémentation en acide cholique diminue la mortalité de ces souris (Ishibashi et coll., 1996).

Parmi les différents immunosuppresseurs responsables d'hypercholestérolémie, seul l'effet de la CsA a été évalué sur l'activité CYP7A1 qui ne subit pas de variation significative (Princen et coll., 1991 ; Souidi et coll., 1999).

2.1.2. la stérol 12α-hydroxylase (CYP8B1).

La stérol 12α-hydroxylase (CYP8B1) est l'enzyme déterminant le type d'acides biliaires primaires synthétisés. Si elle est inactive, la formation d'acide chénodéoxycholique (ACDC) (hydrophobe) est privilégiée. En conséquence les enzymes initiatrices du métabolisme des acides biliaires, CYP7A1 et CYP27A1 sont réprimées par l'ACDC.
Toutefois, aucun effet des immunosuppresseurs n'est décrit à ce jour sur l'expression ou l'activité de cette enzyme.

2.2. La voie acide (ou alternative)

L'importance de cette seconde voie a été établie plus récemment, elle contribue à environ 50 % de la biosynthèse des acides biliaires et conduit préférentiellement à la formation d'ACDC (Princen et coll., 1991; Vlahcevic et coll., 1997).

2.2.1. La stérol 27-hydroxylase (CYP27A1)

La stérol 27-hydroxylase, située dans la membrane interne des mitochondries, initie la voie acide de la biosynthèse des acides biliaires à partir du cholestérol mais métabolise également différents oxystérols. Cette enzyme a une large spécificité de substrats comprenant différents oxystérols en plus du cholestérol. Le CYP27A1 n'est pas localisé uniquement dans le foie mais également dans différents tissus ou cellules comme les poumons, l'intestin, les artères, les surrénales, les ovaires, les testicules, les cellules endothéliales, les macrophages et les fibroblastes (Anderson et coll, 1989 ; Crisby et coll, 1997 ; Rennert et coll, 1990 ; Reiss et coll, 1997). Il existe de nombreuses mutations responsables d'une déficience en CYP27A1 hépatique et extra-hépatique qui conduisent à une xanthomatose cérébrotendineuse caractérisée par l'accumulation de lipides et de cholestérol ce qui aboutit à une athérosclérose accélérée, des dysfonctionnements neurologiques, une cataracte ou le développement de xanthomes dans le cerveau, les poumons et les tendons (Salen et coll., 1987).

La stérol 27-hydroxylase est considérée comme une enzyme anti-athérosclérotique car elle facilite non seulement l'élimination du cholestérol mais inhibe également sa synthèse et son apport extra-cellulaire (Shanahan et coll, 2001 ; Esterman et coll., 1983). Ainsi, chez les

souris cyp27a1-/- la biosynthèse hépatique de cholestérol est augmentée ainsi que l'expression de l'HMGR, du récepteur des LDL (LDL-R) et des HDL (SRBI) (Repa et coll., 2000).
La CsA inhibe de façon compétitive l'activité stérol 27-hydroxylase (Princen et coll., 1991 ; Winegar et coll., 1996 ; Souidi et coll., 1999). Or le 27-hydroxycholestérol est probablement un régulateur important de l'homéostasie du cholestérol. La diminution de la concentration du 27-hydroxycholestérol limiterait le rétrocontrôle négatif qu'il exerce sur l'expression de l'HMGR (Axelson et Larsson 1995 ; Javitt 1994). De plus quand des macrophages exprimant CYP27A1 sont exposés à une inhibition par la CsA, on observe une accumulation de cholestérol dans ces cellules (Diczfaluzy et coll., 1996). Cette inhibition de CYP27A1 aboutirait non seulement à un catabolisme diminué du cholestérol mais aussi à une augmentation de sa synthèse liée à l'augmentation d'expression de l'HMGR. L'inhibition de CYP27A1 se traduit aussi par une diminution d'ACDC alors que le taux d'acide cholique (AC) n'est pas affecté (Mizuta et coll., 1999).

2.2.2. L'oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1)

L'oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1) est initialement identifiée comme une enzyme participant à la biosynthèse des neurostéroïdes dans le cerveau. Le CYP7B1 est également exprimé dans le foie, les fibroblastes et les ovaires de rat (Chiang, 1998). Son importance dans la biosynthèse des acides biliaires a été établie plus récemment du fait de sa capacité à métaboliser des oxystérols, intermédiaires de la biosynthèse des acides biliaires dont le 27-hydroxycholestérol.

Cette enzyme de la voie alternative de la biosynthèse des acides biliaires est également inhibée par la CsA (Souidi et coll., 2000) ce qui expliquerait en partie la diminution de la biosynthèse de l'ACDC en présence de CsA.

3. Effets sur les récepteurs des lipoprotéines

3.1. Le récepteur des LDL

Le récepteur des LDL (LDL-R) permet la capture par le foie des lipoprotéines riches en cholestérol, par l'intermédiaire des apolipoprotéines B et E. Il est régulé par certains oxystérol et par le cholestérol lui-même et participe ainsi à l'homéostasie du cholestérol plasmatique

(Brown et Goldstein, 1986). En dehors de ce rôle essentiel permettant la diminution du LDL-cholestérol plasmatique, le LDL-R facilite également l'apport de cholestérol aux cellules (Nimpf et Schneider, 2000).

Le LDL-R est exprimé dans différents types cellulaires. Néanmoins, il n'est pas exprimé dans l'intima d'artères normales ou athérosclérotiques humaines (Luoma et coll., 1994). L'absence d'expression de l'ARNm et de la protéine pourrait être expliquée par l'inhibition du LDL-R à cause d'une forte concentration de LDL-cholestérol dans le liquide extra-cellulaire artériel (Hiltunen et Yla-Hertulla, 1998).

Le LDL-R est également sensible à l'action de la CsA qui diminue son expression ainsi que son activité (Winegar et coll., 1996 ; Rayyes et coll., 1996). En plus de l'inhibition de la dégradation du cholestérol (CYP27A1) cet effet sur le récepteur des LDL, pourrait jouer un rôle important dans l'augmentation du taux de cholestérol plasmatique observé après traitement par les immunosuppresseurs, dont la ciclosporine et la rapamycine.

3.2. Le récepteur des HDL

Depuis 1996, SR-BI (scavenger receptor class B type I) a été identifié comme un récepteur actif des HDL (Acton et coll., 1996). Il reconnaît les apolipoprotéines sur la surface des particules HDL incluant leur composant majeur, l'apoAI. Cette protéine trans-membranaire est exprimée dans le foie mais aussi dans l'intestin, le tissu adipeux et les poumons et dans les macrophages (Rigotti et coll., 1997).

La surexpression hépatique de SR-BI chez les souris diminue fortement les HDL plasmatiques et augmente le taux de cholestérol biliaire (Kozarsky et coll., 1997). Alors que chez des souris dont le gène codant pour SR-BI est invalidé, on observe une augmentation de la cholestérolémie (Rigotti et coll., 1997). Ainsi SR-BI permet la capture par le foie des HDL mais favoriserait également l'efflux de cholestérol libre. Si SR-BI a un rôle similaire dans le métabolisme des lipoprotéines chez la souris et chez l'homme, SR-BI pourrait influencer le développement et la progression de l'athérosclérose et serait un candidat potentiel comme cible thérapeutique. Toutefois, aucun effet des immunosuppresseurs n'est décrit à ce jour sur l'expression ou l'activité du récepteur HDL.

4. Effets sur le transport des acides biliaires et des lipoprotéines

4.1. Transport des acides biliaires

Les immunosuppresseurs ont aussi une action sur les transporteurs des acides biliaires. Une étude récente a démontré que la RAPA et la CsA diminuent le flux biliaire alors que la CsA et le TRL diminuent également l'excrétion biliaire de cholestérol (Deters et coll., 2001 ; Deters et coll., 2002). De plus, la CsA et la RAPA sont responsables chez le rat d'une diminution de l'expression de MRP2 impliqué dans l'efflux des acides biliaires alors que l'expression de OATP est augmentée (entrée de sels biliaires dans l'hépatocyte) conduisant probablement à l'accumulation de métabolites toxiques dans l'hépatocyte (Bramow et coll., 2001). Dans cette étude, l'expression d'autres transporteurs des acides biliaires tels que NTCP (Na^+-taurocholate cotransporting polypeptide) ou BSEP (bile salt export pump) n'est pas modifiée. Sachant que chez l'homme MRP2 est régulé par les récepteurs nucléaires FXR et PXR (Kast et coll., 2002), les immunosuppresseurs pourraient donc agir *via* ces récepteurs nucléaires. Différentes études ont montré que l'activation de FXR *in vivo* est associée à une diminution du taux de triglycérides plasmatiques (Kast et coll., 2001 ; Sinal et coll., 2000 ; Maloney et coll., 2000).

4.2. Transport du cholestérol et des triglycérides

Les apolipoprotéines (apo) jouent un rôle clé dans le transport du cholestérol et des triglycérides du fait de leur reconnaissance par les récepteurs cellulaires (apoB, E, AI) et de leur rôle d'activateurs ou d'inhibiteurs enzymatiques (apoAI et CIII).

<u>ApoB :</u>

L'apoB100 est l'apolipoprotéine qui répond le plus à la RAPA. C'est l'apolipoprotéine majeure des VLDL, qui transportent les triglycérides, et des LDL, qui transportent le cholestérol. Elle est corrélée de façon positive avec le LDL-cholestérol, c'est-à-dire la fraction athérogène du cholestérol. L'hypercholestérolémie due à la RAPA est associée à une concentration élevée de LDL-cholestérol et à une augmentation de LDL-apoB100 probablement due à une diminution du catabolisme des lipoprotéines contenant l'apoB100.

Chez les patients traités par la RAPA, une valeur élevée de VLDL-apoB100 est également observée. L'analyse cinétique montre que cela est dû à une réduction du catabolisme des VLDL-apoB100 plutôt qu'à une augmentation de la synthèse (Hoogeven et coll., 2001). Ceci expliquerait en partie l'hypertriglycéridémie causée par la RAPA.

ApoCIII :

L'apoCIII est également significativement augmentée par la RAPA, la CsA et le TRL. Or l'apoCIII est un inhibiteur de la lipoprotéine lipase, laquelle diminue chez les patients transplantés aboutissant à une diminution de l'hydrolyse des triglycérides des VLDL ce qui pourrait participer à l'hypertriglycéridémie observée après transplantation. En effet, l'augmentation des triglycérides est du même ordre de grandeur que celle de l'apoCIII en présence de RAPA (Tur et coll., 2000).

ApoAI :

L'apoAI est l'apolipoprotéine principale des HDL. Elle augmente l'activité enzymatique de la lécithine cholestérol acyl transférase (conversion du cholestérol en esters de cholestérol) qui joue un rôle fondamental dans le transport inverse du cholestérol. Les effets antiathérogènes des HDL sont partiellement médiés par l'apoAI (Rubin et coll, 1991). Récemment Claudel et coll. (2002) ont démontré que certains acides biliaires répriment l'expression de l'apoAI dans des hépatocytes d'origine humaine. Etant donné les effets des immunosuppresseurs sur la biosynthèse des acides biliaires, l'expression de l'apoAI pourrait être également altérée.
L'effet de la RAPA sur l'apoAI n'est pas clairement établi : le taux d'apoAI augmente de plus de 50% chez certains patients alors qu'il ne varie pas chez d'autres (Morissett et coll., 2002 ; Gonzalez-Amieva et coll., 2000).

ApoE :

L'apoE est principalement retrouvée dans les LDL et les VLDL permet leur reconnaissance par le LDL-R. Le polymorphisme de l'apoE est un facteur influençant le développement de l'hyperlipidémie après transplantation. Les sujets porteurs du génotype apoE3/E2 ont un taux plasmatique de triglycérides plus élevé que tous les autres génotypes (Gonzalez-Amieva et

coll., 2000). Toutefois, la concentration plasmatique de cette apolipoprotéine ne varie pas après traitement par la CsA ou la RAPA.

Apo (a) :

L'apo(a), un composant majeur des particules Lp(a) peut également favoriser le développement de maladies cardiovasculaires et notamment la thrombose en interférant avec la conversion du plasminogène en plasmine à la surface des cellules endothéliales. Les lipoprotéines Lp(a), contenant également l'apoB, semblent jouer un rôle important dans le développement des maladies cardiovasculaires. Une augmentation plasmatique de Lp(a) favorise l'athérosclérose du fait de sa forte teneur en cholestérol estérifié.
La CsA provoque une augmentation de Lp(a) et une augmentation de la susceptibilité des LDL à l'oxydation (Andany et coll., 2001). Par ailleurs, des études cinétiques montrent que le traitement par la RAPA réduit la clairance des VLDL et des LDL.

5. Mécanisme de l'hypertriglycéridémie

La concentration physiologique de triglycérides est de 0,3 à 1,4 g/l (ou 0,33 à 1,58 nmol/l) et est supérieur à 2 g/l (2,26 nmol/l) en cas d'hypertriglycéridémie. Les triglycérides sont soit d'origine exogène, apportés par l'alimentation, soit d'origine endogène et principalement synthétisés par le foie :

(1) Les graisses alimentaires sont secrétées par les cellules intestinales sous forme de chylomicrons grâce à la participation de l'apoB48. Les triglycérides situés dans le cœur des chylomicrons sont alors hydrolysés en acides gras libres et glycérol par la lipoprotéine lipase (LPL) à l'aide de l'apoCII qui sert de cofacteur, produisant ainsi des remnants de chylomicrons. Ces remnants sont captés par le foie à l'aide du récepteur LRP (LDL-like receptor protein). La lipoprotéine lipase hydrolyse les triglycérides contenus dans les lipoprotéines riches en triglycérides, c'est à dire les VLDL et les chylomicrons permettant la transformation des LDLs en HDLs. La déficience héréditaire en lipoprotéine lipase est associée à une hypertriglycéridémie.

(2) La synthèse endogène des VLDL riches en triglycérides et leur sécrétion par le foie nécessite l'apoB100. Les triglycérides sont formés dans le foie à partir du glycérol cellulaire

et des acides gras véhiculés par le sang. Le processus de synthèse hépatique des triglycérides s'effectue en 2 séries distinctes de réactions successives à partir d'acide gras provenant de la synthèse *de novo* ou de la captation hépatique d'acides gras et de glycérol qui seront associés à l'aide notamment de 2 enzymes clés, la glycérol 3-phosphate acyltransférase (GPAT) et la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) (Bauchart et coll., 1997).

Ainsi, une augmentation du taux de triglycérides peut être due à une surproduction de VLDL (anabolisme), à une faible activité de la LPL (catabolisme) ou à un taux élevé d'apoCIII qui inhibe la LPL. Des déficiences génétiques en apoCII et E (Ghiselli et coll., 1982 , Fojo et coll, 1992) ou la surexpression d'apoCIII chez des souris (Ito et coll., 1990) sont également responsables d'hypertriglycéridémies.
Récemment, différentes études ont révélé l'importance du récepteur nucléaire des oxystérols (LXR) dans le contrôle de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras et donc des triglycérides (Schultz et coll., 2000). Comme nous l'avons vu précédemment, chez la souris, la déficience en cyp27a1 aboutit à une augmentation de la biosynthèse du cholestérol dans le foie mais également à la stimulation de l'expression de différents gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras associés à une hypertriglycéridémie (Repa et coll., 2000).

L'hypertriglycéridémie a été récemment explorée (Morrisett et coll., 2002) à propos de la RAPA, grâce à la mesure du taux d'incorporation des triglycérides dans les lipoprotéines VLDL, IDL et LDL. Le traitement immunosuppresseur provoque une diminution de leur incorporation suggérant que la RAPA augmente le pool plasmatique d'acides gras libres, ce qui aboutit à une augmentation de la synthèse hépatique des triglycérides secrétés par les VLDL. L'hyperlipémie induite par la CsA ou le TRL comporte également une augmentation des VLDL et des triglycérides (Ichimaru et coll, 2001).
Un traitement par la RAPA ou la CsA diminue l'activité LPL (Gonzalez-Amiera et coll., 2000 ; Vaziri et coll., 2000 ; Hoogeven et coll, 2001) alors que le taux d'apoCIII est augmenté de 50% pour la CsA (Ichimura et coll., 2001) à 92 % pour la RAPA (Morrisett et coll., 2002).

Conclusion

Les immunosuppresseurs sont responsables d'effets indésirables hyperlipémiants qui peuvent aboutir à différentes maladies cardiovasculaires. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans le développement de ces effets indésirables permettra de mieux adapter le traitement immunosuppresseur et l'éventuel traitement associé. Ils perturbent profondément le métabolisme des acides biliaires et plus particulièrement certaines enzymes à cytochromes P450 impliquées dans cette voie de biosynthèse. Le métabolisme des acides biliaires étant la principale voie d'élimination du cholestérol chez l'homme, la dérégulation de cette voie de biosynthèse pourrait conduire à une augmentation du taux de cholestérol et de triglycérides. Par ailleurs, ils perturbent également le métabolisme lipidique donc le transport du cholestérol et des triglycérides ce qui pourrait également contribuer à l'augmentation plasmatique de LDL-cholestérol et de triglycérides observés chez de nombreux patients. En effet, l'expression et l'activité du LDL-R qui est un récepteur majeur dans l'homéostasie du cholestérol sont diminuées après traitement par la CsA alors que la sécrétion de différentes apolipoprotéines clés dont l'apoB, l'apoCIII et l'apoAI est également perturbée par la CsA ou la RAPA. De plus, il existe peu d'études *in vitro* à ce jour sur les mécanismes impliqués dans le développement de l'hyperlipidémie, si ce n'est à propos de la CsA. Toutefois, de nombreux essais cliniques associent désormais différents immunosuppresseurs qui ont des effets thérapeutiques synergiques, ce qui permet de diminuer les doses administrées et ainsi les effets hyperlipémiants. Par ailleurs, un traitement complémentaire par des statines diminue efficacement l'hyperlipidémie observée chez les patients transplantés.

REGULATION DU CATABOLISME DU CHOLESTEROL
IMPLICATION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES

Yann GUEGUEN, Luc FERRARI et Anne-Marie BATT

INSERM U525, Université Henri Poincaré - Nancy 1, 30 Rue Lionnois, 54000 Nancy, France

Revue acceptée dans Regard sur la Biochimie (n°1, 2003)

Les auteurs

Yann Guéguen *est doctorant dans l'équipe. Il s'intéresse particulièrement aux mécanismes de l'hyperlipidémie causée par les immunosuppresseurs, notamment sur le métabolisme des acides biliaires et du cholestérol.*
Luc Ferrari *est Maître de Conférence en Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Nancy, UHP. Après une thèse sur les effets de l'interleukine-1β sur les P450s et un stage post-doctoral à l'université Emory (Atlanta, GA) il s'est intéressé aux cytochromes P450 impliqués dans les maladies cardiovasculaires*
Anne-Marie Batt *est professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré, Nancy I.*

Introduction

Le cholestérol assure plusieurs fonctions biologiques capitales, il participe à la structure des membranes cellulaires et il est le précurseur des hormones stéroïdiennes et des acides biliaires. A l'intérieur de chaque cellule des mécanismes complexes régulent le taux de cholestérol. Le foie joue un rôle central dans l'homéostasie du cholestérol : il effectue la synthèse du cholestérol et est l'organe essentiel de la transformation du cholestérol en acides biliaires. La synthèse hépatique des acides biliaires, à partir du cholestérol, est une voie métabolique particulièrement importante permettant d'éliminer environ 50 % de la quantité de cholestérol ingéré quotidiennement (Princen et coll., 1991). Les acides biliaires ont également un rôle physiologique de détergent envers les molécules liposolubles, ce qui facilite le transport du cholestérol et des vitamines liposolubles par la formation de micelles. Ainsi les acides biliaires sont requis pour l'élimination du cholestérol par le foie, le transport de lipides dans l'intestin, la stimulation de l'excrétion biliaire et la régulation de la biosynthèse du cholestérol.

La biosynthèse des acides biliaires a lieu via 2 voies majeures :

- la voie classique (ou neutre) qui comporte principalement la cholestérol 7α-hydroxylase (CYP7A1), dont le gène et la région 5'flanquante ont été séquencés chez l'homme (Cohen et coll., 1992)
- la voie alternative (ou acide) initiée par la stérol 27-hydroxylase (CYP 27A1), anciennement nommée 26-hydroxylase et dont le gène a été également séquencé chez l'homme (Cali et Russell, 1991).

La transformation du cholestérol en acides biliaires met en jeu une vingtaine d'enzymes hépatocytaires différentes, impliquant une cascade de réactions au niveau du réticulum endoplasmique, du cytosol, des mitochondries et des peroxysomes (Princen et coll., 1997). Les acides biliaires primaires ainsi formés sont l'acide cholique hydrophile (AC) et l'acide chénodésoxycholique hydrophobe (ACDC) (**Figure 7**). Les acides primaires synthétisés par le foie sont soumis à un cycle entéro-hépatique qui permet la conservation de 95 % du pool des acides biliaires en conditions physiologiques. Dans l'intestin, les acides biliaires primaires sont métabolisés en acides biliaires secondaires, l'acide déoxycholique (ADC) et l'acide lithocholique (ALC).

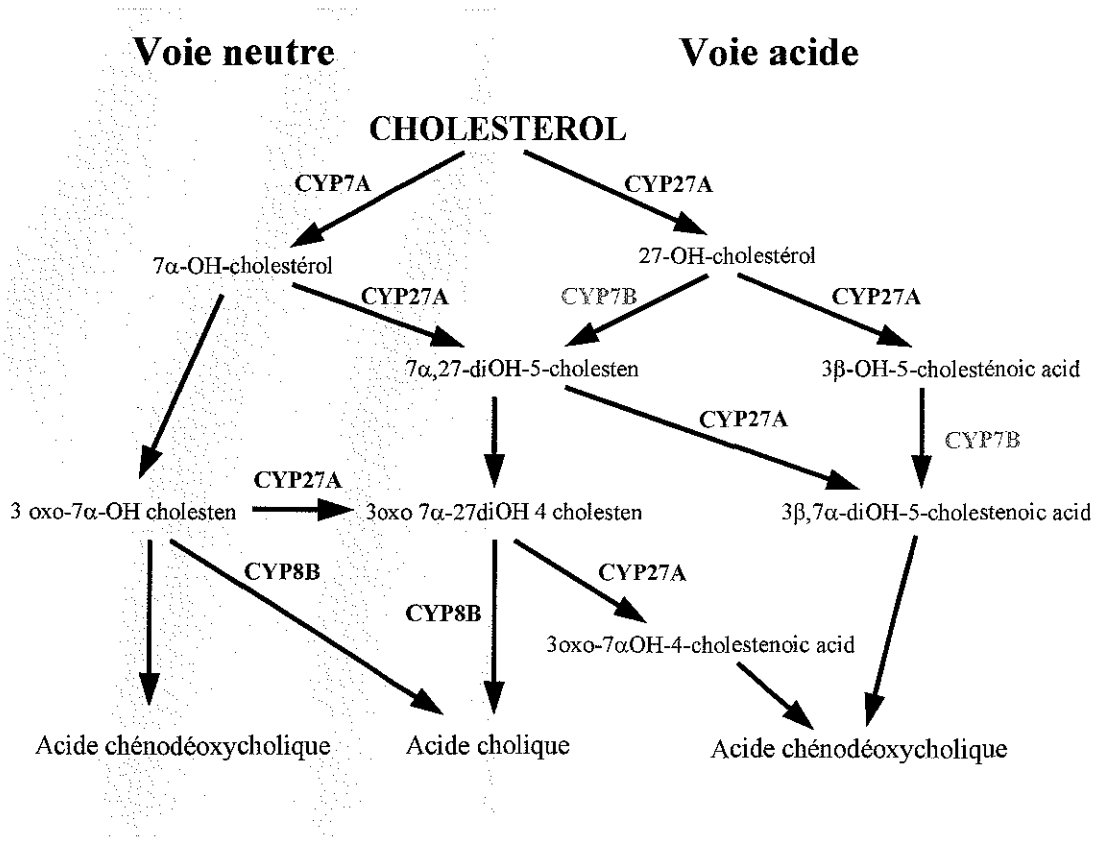


Figure 7 *: Rôle des cytochromes P450 dans la biosynthèse des acides biliaires chez l'homme.* Cholestérol 7α-hydroxylase (CYP7A) ; stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) ; oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1) ; stérol 12α-hydroxylase (CYP8B1).

Quatre cytochromes P450 jouent un rôle important dans la biosynthèse des acides biliaires : les CYP 7A1 et 27A1 qui initient la dégradation du cholestérol et les CYP7B1 et 8B qui génèrent certains métabolites intermédiaires. Leur régulation fait intervenir de nombreux facteurs de transcription dont les récepteurs nucléaires « orphelins » FXR, LXR et PXR qui participent à la régulation transcriptionnelle par les acides biliaires primaires, les oxystérols et les acides biliaires secondaires. Ils interviennent dans le rétrocontrôle de la biosynthèse des acides biliaires mais également sur de nombreux gènes impliqués dans la régulation du taux de cholestérol : le transport du cholestérol et des acides biliaires, le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques et l'efflux cellulaire de cholestérol et des acides biliaires.

La voie neutre et sa régulation

La cholestérol 7α-hydroxylase (CYP7A1)

La cholestérol 7α-hydroxylase (CYP7A1) est un cytochrome P450 du réticulum endoplasmique qui catalyse l'étape initiale et limitante de la biosynthèse des acides biliaires (***Figure** 7*). Son gène, situé sur le bras long du chromosome 8 (8q11-q12), d'une longueur de 10 kb comprend 6 exons et 5 introns. Cette enzyme a été détectée uniquement dans le foie et est spécifique de la 7α-hydroxylation du cholestérol. La pathologie la plus connue, associée au CYP7A1, est la lithiase biliaire cholestérolique qui résulte d'un taux élevé de cholestérol qui précipite et forme des calculs dans la vésicule biliaire (Erlinger, 1994). Les souris déficientes en cyp7a1 ont un phénotype d'atteinte sévère, 85 % des souriceaux ne survivent pas au-delà de 18 jours et présentent une diminution du métabolisme biliaire, lipidique et vitaminique. La supplémentation en acide cholique diminue la mortalité de ces souris (Ishibashi et coll., 1996).

Régulation transcriptionnelle de CYP7A1 :

Le promoteur du gène CYP7A1 est un exemple typique de promoteur liant l'ARN polymérase II en aval d'une boîte TATA et contenant différents éléments d'activation en *cis* contrôlant l'activité transcriptionnelle de ce promoteur (Wang et coll., 1996). La majorité des études à ce jour suggèrent que le gène du CYP7A1 est essentiellement régulé au niveau transcriptionnel par un large spectre de stimuli incluant les acides biliaires, le cholestérol, les hormones, le rythme circadien et des seconds messagers (Vlahcevic, 1996).

La régulation par les acides biliaires de l'activité de CYP7A1 a été très largement étudiée (***Tableau** 3*). Les acides biliaires, qui retournent au foie par la veine porte, exercent un rétrocontrôle négatif sur leur biosynthèse en réprimant l'expression de CYP7A1. Des études plus récentes sur la région 5' flanquante du gène ont mis en évidence deux éléments de réponse aux acides biliaires (BAREs) qui semblent être responsables de cet effet (Chiang et coll., 1994 ; Stroup et coll., 1997 ; Crestani et coll., 1998). BARE II est l'élément de réponse majeur des acides biliaires. Les acides biliaires exerceraient ce rétrocontrôle négatif *via* FXR (Farnesoïd X Receptor), un récepteur nucléaire hormonal dont les acides biliaires sont des ligands physiologiques (Makishima et coll., 1999). Les acides biliaires lient et activent FXR, qui forme alors un complexe avec SHP (Small Heterodimer Partner) pour réprimer le facteur

de transcription LRH-1, nécessaire pour la transcription de CYP7A1 (***Figure8***) (Lu et coll, 2000, Edwards et coll., 2002). En plus de sa fonction dans la synthèse des acides biliaires, le CYP7A1 joue un rôle dans la régulation de la concentration hépatocytaire de cholestérol. A partir de cholestérol il initialise la production d'oxystérols, lesquels inhibent l'enzyme clé de la synthèse du cholestérol : l'HMGR (Lund et coll., 1994).

Tableau 3 *: Facteurs de transcription impliqués dans la régulation du promoteur du gène CYP7A1 (pour revue voir Crestani et coll.., 1998)*

Facteurs de transcription	Séquences consensus	Fonctions
DBP (D-site binding protein)	-227 ATGTTATGTCA -216	Rythme circadien
C/EBP (CATT enhancer binding protein)	–146 TGGACTtAGTTCA – 134 (BARE II)	
COUP-TFII (chiken ovalbumin upstream TF)	–146 TGGACTtAGTTCA – 134 (BARE II) –72 TGGTCActcaAGTTCA –57 (BARE I)	Coactivation avec HNF-4
HNF-3 (hepatocyte nuclear factor 3)	-175 TGTTTGTTCT–166	Expression basale et régulation par l'acide rétinoïque
HNF –4 (hepatocyte nuclear factor 4)	–146 TGGACTtAGTTCA – 134 (BARE II)	Coactivation avec COUP-TF
CBP (CREBP-binding protein)		Coactivation
SHP (small heterodimer protein)	–146 TGGACTtAGTTCA – 134 (BARE II)	Inhibition induite par FXR
FXR (farnesoïd X receptor)	TGGACTtAGTTCA	Rétro-inhibition par les acides biliaires
LXR (liver X receptor)	–72 TGGTCActcaAGTTCA –57 (BARE I)	Activation par les oxystérols
RXR (retinoid X receptor)	–146 TGGACTtAGTTCA – 134 (BARE II)	Co-répresseur ou co-activateur
PPARα (peroxysome proliferator-activated receptor)	–146 TGGACTtAGTTCA – 134 (BARE II)	Inhibition

De nombreux autres éléments de réponse à divers facteurs de transcription ont également été identifiés dans le promoteur du gène CYP7A1 (***Tableau 3***) : facteurs de transcription DBP (D-site Binding Protein) et C/EBP (CAAT Enhancer Binding Protein) (Lee *et coll..*, 1994), COUP-TFII (Chicken Ovalbumin Upstream Transcription Factor) (Stroup et Chiang, 2000), LXR (Liver X Receptor) (Lehman et coll, 1997), PPARα (Peroxysome Proliferator-Activated

Receptor α) (Marrapodi et coll, 2000), HNF-3 (Hepatocyte nuclear factor) (Wang et coll, 1996) et HNF-4 (Cooper et coll, 1997). L'élément de réponse BARE-II lie le facteur HNF-4 mais aussi l'hétérodimère RAR/RXR qui médie la stimulation par l'acide rétinoïque (Stroup et coll, 1997) (***Tableau 3***).

Polymorphisme du CYP7A1 :

Sept polymorphismes ont été identifiés sur le gène du CYP7A1, dont quatre se situant au niveau de la région promotrice (***Tableau 4***). Dans ces différentes études sur les polymorphismes de ce promoteur, les activités enzymatiques correspondantes n'ont pas été mesurées, nous ne pouvons donc que spéculer sur leur influence. Par ailleurs, le taux de LDL-C semble être directement corrélé à certains de ces polymorphismes (***Tableau 4***) (Couture et coll, 1999). De plus, une étude récente sur une famille comportant de nombreuses personnes hypercholestérolémiques a révélé l'existence d'une déficience en CYP7A1 due à une délétion du gène chez ces individus (Pullinger et coll, 2002).

Tableau 4 *: Polymophismes du CYP 7A1 chez l'homme*

Localisation	Type	Fréquence allèlique H	Fréquence allèlique F	Phénotype	Références
-554	Substitution T → C	0.405		↑ LDL-C	Wang et coll, 1998
- 278	Substitution C → A	0.41	0.43	↑ LDL-C	Wang et coll, 1998 Hegele et coll, 2001
- 469	Substitution T → C				Thompson et coll, 1993
- 204	Substitution A → C	0.38	0.41	↑ LDL-C	Couture et coll, 1999
100	*Substitution T → C*				Karam et coll, 1992
347	Substitution G → A				Karam et coll, 1992
385	Substitution A → G				Karam et coll, 1992
413	Mutation frameshift			pas d' activité CYP7A Hyperlipidémie	Pullinger et coll, 2002

La stérol 12α-hydroxylase (CYP8B1).

Dans la voie neutre, l'enzyme déterminant le type d'acides biliaires synthétisés est la stérol 12α-hydroxylase (CYP8B1). Cela lui confère la possibilité d'orienter la synthèse des acides

biliaires vers la formation d'acides biliaires hydrophiles (cholique) ou hydrophobes (chénodésoxycholique) selon qu'elle agit ou non (***Figure** 7*). Les acides biliaires hydrophobes exercent un rétrocontrôle négatif sur l'expression du CYP7A1 ainsi que sur l'activité du CYP8B1 favorisant ainsi la formation d'acide cholique (Chiang, 2002).

La voie acide et sa régulation

Dans les hépatocytes humains, la voie acide contribue au moins à 50 % de la biosynthèse des acides biliaires et conduit préférentiellement à la formation d'acide chénodésoxycholique (Princen et coll, 1991 ; Vlahcevic et coll, 1997). La voie acide est initiée par la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1).

La stérol 27-hydroxylase (CYP27A1)

La stérol 27-hydroxylase est un cytochrome P450 localisé dans la membrane interne des mitochondries. C'est une enzyme multifonctionnelle qui produit en plus du 27-hydroxycholestérol des intermédiaires acides lors du métabolisme des acides biliaires d'ou le nom de voie acide. Son gène est situé sur le bras long du chromosome 2 (2q33-qter) (Cali et Russel, 1991) et occupe au moins 18,6 kb comprenant 9 exons et 8 introns (Leitersdorf et coll, 1993). Cette enzyme a une large spécificité de substrats comprenant différents oxystérols tout comme le cholestérol (***Figure** 7*). Le CYP27A1 est une enzyme ubiquitaire, située dans différents tissus ou cellules comme les poumons, l'intestin, les artères, les surrénales, les ovaires, les testicules, les cellules endothéliales, les macrophages et les fibroblastes (Anderson et coll, 1989 ; Crisby et coll, 1997 ; Rennert et coll, 1990 ; Reiss et coll, 1997).

La déficience en CYP27A1 et la Xanthomatose cérébrotendineuse

Le 27-hydroxycholestérol est l'hydroxycholestérol circulant le plus abondant chez l'homme, avec une concentration moyenne d'environ 0,4 µM chez les sujets normaux (Dzeletovic et coll, 1995). La déficience en CYP27A1 hépatique et extra-hépatique (polymorphisme génétique) conduit à une xanthomatose cérébrotendineuse caractérisée par l'accumulation de lipides et de cholestérol ce qui aboutit à une athérosclérose accélérée, des dysfonctionnements neurologiques, une cataracte, ou le développement de xanthomes dans le cerveau, les

poumons et les tendons (Salen et coll, 1987). Les patients ont une forte diminution de la biosynthèse des acides biliaires (Leitersdorf et coll, 1993) et un pool réduit d'acides biliaires (en particulier l'acide chénodésoxycholique). Tous les variants allèliques identifiés sont responsables de ce déficit (***Tableau 5***).

Tableau 5 *: Polymorphismes du CYP27A1 chez l'homme*

Localisation	Type	Type cellulaire	Références
-12	Substitution épissage G-T	fibroblastes	Chen et coll, 1998a
-1	Substitution épissage G-C		Garuti et coll, 1996
+1	Substitution épissage G-A	fibroblastes	Leitersdorf et coll, 1993 Garuti et coll, 1996
7	Substitution épissage G-A		Shiga et coll, 1999
85	Délétion ATGcGGC		Leitersdorf et coll, 1994
104	Substitution sens CGG-TGG	fibroblastes	Nakashima et coll, 1994
126	Substitution non sens CAG-TAG		Verrips et coll, 1996
141	Délétion TACgGAT		Verrips et coll, 1996
162	Substitution non sens GAG-TAG		Wakamatsu et coll, 1999
239	Délétion GGAtGGT	lymphocytes	Leitersdorf et coll, 1993
306	Substitution sens ACG-ATG	fibroblastes	Reshef et coll, 1994
362	Substitution sens CGT-TGT		Cali et coll, 1991
362	Substitution sens CGT-AGT	globules blancs	Chen et coll, 1998b
372	Substitution sens CGG-CAG	fibroblastes	Chen et coll, 1997
441	Substitution sens CGG-CAG	fibroblastes	Kim et coll, 1994
441	Substitution sens CGG-TGG	fibroblastes	Kim et coll, 1994
446	Substitution sens CGC-TGC		Cali et coll, 1991

Régulation transcriptionnelle

Contrairement au CYP7A1, la régulation du CYP27A1 est peu connue chez l'Homme. Néanmoins, la région promotrice est riche en résidus GC et contient des sites de liaison potentiels pour le facteur de transcription Sp1 et le facteur de transcription hépatique LF-B1 (Leitersdorf et coll, 1993). Le CYP27A1 est régulé négativement au niveau transcriptionnel et traductionnel, par les acides biliaires, de la même façon que le CYP7A1 (Twisk et coll, 1995 ; Vlahcevic et coll, 1996) et positivement, par le cholestérol (Stravitz et coll, 1996 ; Reiss et

coll, 1997). Le rétrocontrôle par les acides biliaires ferait intervenir également le récepteur nucléaire FXR.

Implication dans l'homéostasie du cholestérol

Il a été suggéré que le CYP27A1 joue un rôle important dans la régulation de la synthèse du cholestérol puisque les oxystérols sont connus pour être de puissants régulateurs de l'HMGR et de l'expression du LDL-R (Goldstein et Brown, 1990). Le 27-hydroxycholestérol, en particulier, et son acide sont décrits comme des répresseurs de l'HMGR mais ils peuvent aussi influencer la capture cellulaire des lipoprotéines en agissant sur l'expression des récepteurs aux LDL (LDL-R) (Esterman, 1983 ; Goldstein et Brown 1990). Conformément à ces travaux, chez les souris cyp27a1-/- la biosynthèse hépatique du cholestérol est augmentée ainsi que l'expression de l'HMGR, du récepteur des LDL et des HDL (SRBI) (Repa et coll, 2000).

En effet, une étude récente a montré qu'une surexpression du CYP27A1 est couplée à une diminution de la biosynthèse du cholestérol dans les cellules CHO (Hall et coll, 2001). Le 27-hydroxycholestérol, un constituant normal du plasma, est le principal oxystérol présent dans les plaques athérosclérotiques (Crisby et coll, 1997). Ainsi, La stérol 27-hydroxylase pourrait agir comme une enzyme anti-athérosclérotique dans la paroi des vaisseaux en favorisant l'élimination du cholestérol (Björkhem et coll, 1999).

L'oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1)

Récemment l'oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1) située dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries a été proposée comme une deuxième enzyme importante de la voie acide après la CYP27A1. Elle est capable de métaboliser un certain nombre d'intermédiaires de la biosynthèse des acides biliaires et principalement le 27-hydroxycholestérol hépatique (Lee et coll, 1996). Le CYP7B1 est essentiellement exprimé dans le cerveau mais également dans le foie, les fibroblastes et les ovaires de rat (Chiang, 2002). Cette enzyme serait importante non seulement dans la synthèse des acides biliaires mais aussi dans la régulation de la synthèse des oxystérols qui sont des régulateurs potentiels du métabolisme du cholestérol.

Rôle des récepteurs nucléaires « orphelins »

L'homéostasie du cholestérol peut être régulée à différents niveaux : la biosynthèse endogène, le transport, l'absorption intra-cellulaire et l'estérification, ainsi que la conversion métabolique en acides biliaires. Les récepteurs nucléaires orphelins jouent un rôle important dans la régulation de ces différents niveaux (***Figure 7***).

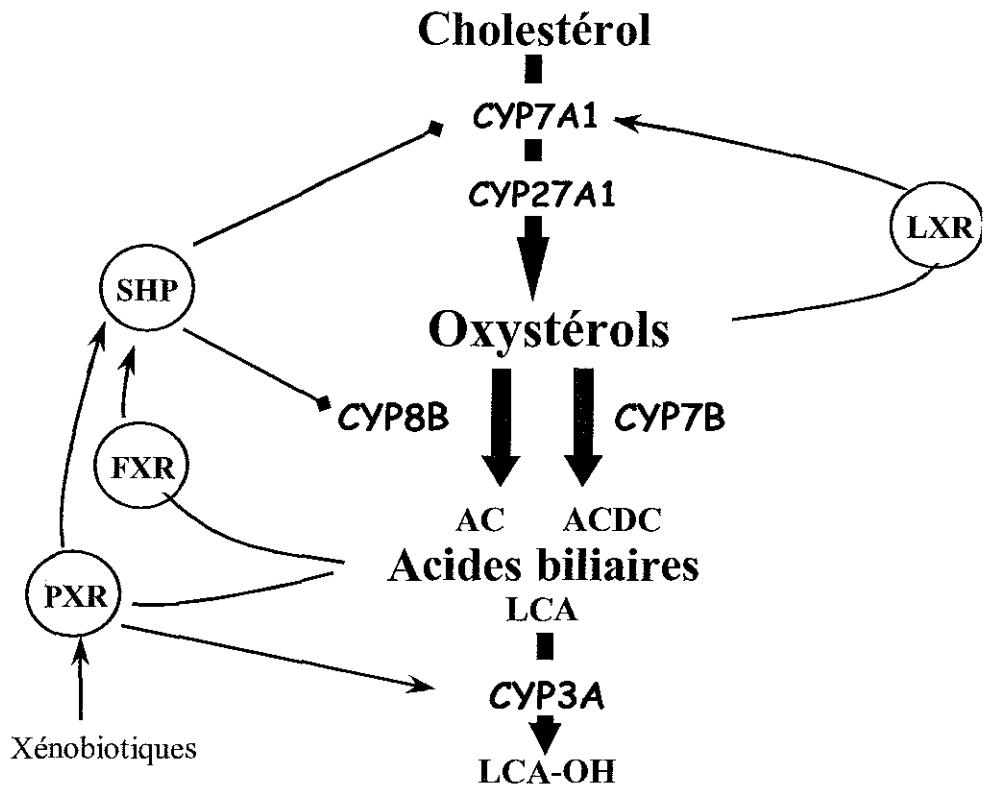


Figure 8 *: Mécanismes de rétrocontrôle du catabolisme du cholestérol par les récepteurs nucléaires LXR, FXR et PXR (liver X receptor, farnesoid X receptor et pregnane X receptor, respectivement)*

CYP7A1 : cholestérol 7α-hydroxylase ; CYP27A1 : stérol 27-hydroxylase ; CYP7B1 : oxystérol 7α-hydroxylase ; CYP8B1 : stérol 12α-hydroxylase.

Les récepteurs nucléaires dont font partie les récepteurs des stéroïdes et des non-stéroïdes, se fixent sur des éléments de réponse aux hormones (HREs) et activent la transcription de gènes cibles. La plupart des récepteurs nucléaires, tels que LXR, FXR et PXR, se lient à l'ADN sous forme d'hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR). Les récepteurs

nucléaires hormonaux ont plusieurs domaines fonctionnels spécifiques : un domaine N-terminal contenant une région activatrice (AF-1), un domaine central de liaison à l'ADN (DBP), des domaines responsables de la translocation nucléaire et de la dimérisation, un domaine d'activation transcriptionnelle de liaison au ligand (AF-2).

FXR (Farnesol X Receptor)

L'élément de réponse hormonal auquel se fixe FXR/RXR est initialement nommé FXRE (Forman et coll, 1995) mais il est également appelé BARE (Bile Acid Response Element) : des études récentes indiquent que les acides biliaires sont les ligands naturels du FXR (Wang et coll, 1999, Makishima et coll, 1999 ; Grober et coll, 1999). Le FXR, ou Farnesol X Receptor, a pour ligands les acides biliaires primaires (Makishima et coll, 1999) en particulier l'acide chénodéoxycholique qui agit à des taux physiologiques (10-15µM) sur ce récepteur nucléaire (Parks et coll, 1999). Il est exprimé dans le foie, les reins et l'intestin, des organes fortement liés au métabolisme des acides biliaires (Forman et coll, 1995).

Le FXR hépatique joue un rôle de détecteur d'acides biliaires. Cette activation de FXR par les acides biliaires est corrélée à une répression indirecte de l'expression des CYP7A1 et CYP8B1 qui met en jeu les récepteurs nucléaires SHP et LRH-1. Le gène codant pour la protéine SHP est directement activé par FXR (***Figure 8***) ; l'augmentation de SHP qui en résulte est responsable de l'inhibition de LRH-1 nécessaire à la transcription des CYP7A1 et CYP8B1 (Goodwin et coll, 2000).

Le gène codant pour BSEP (Bile Salt Export Pump) a récemment été caractérisé comme une cible de FXR (***Figure 9***). Cette protéine facilite le transport des acides biliaires des hépatocytes vers la bile. Dans l'intestin, FXR a également pour gène cible I-BABP (Ileal bile acid binding protein) (***Figure 9***) impliqué dans la recapture des acides biliaires favorisant une diminution de leur concentration et donc leur toxicité.

Tout ceci confirme le rôle central de FXR dans la régulation du métabolisme du cholestérol. Ainsi l'identification des gènes cibles de FXR est nécessaire pour étudier *i)* la régulation hépatique de la biosynthèse des acides biliaires dans le foie, *ii)* l'excrétion biliaire, et *iii)* la recapture intestinale des acides biliaires.

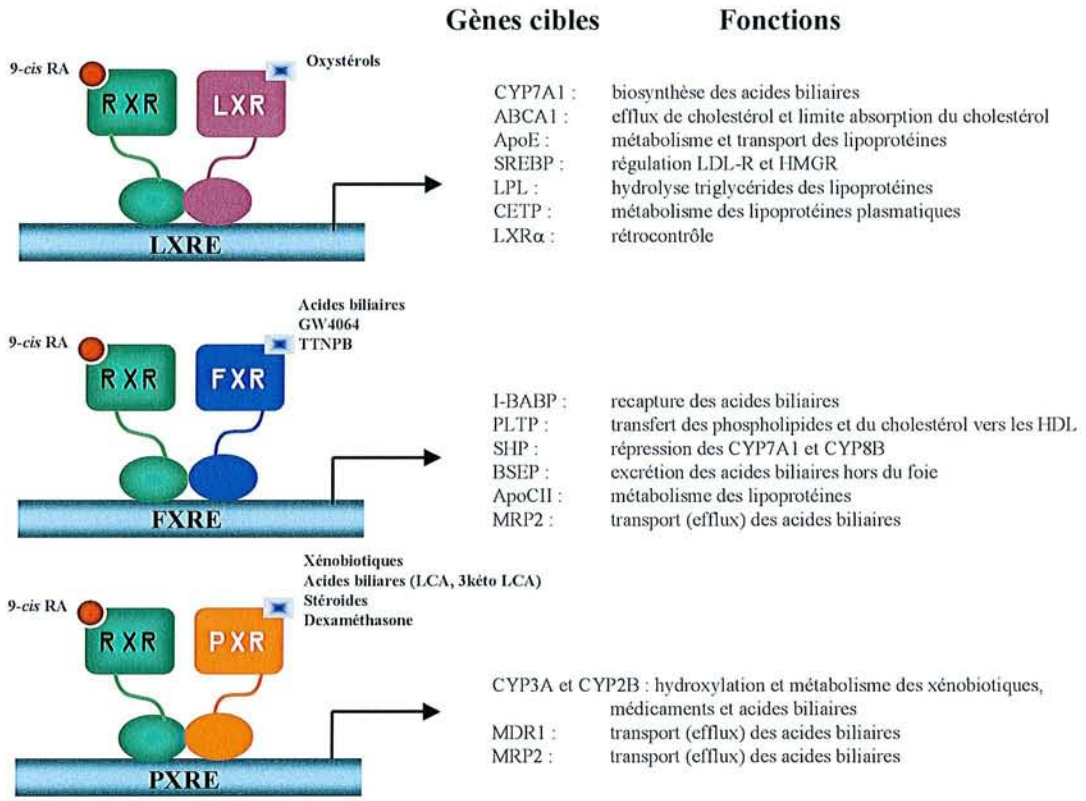


Figure 9 *: Gènes cibles et ligands (non exhaustif) des récepteurs nucléaires LXR, FXR et PXR (liver X receptor, farnesoid X receptor and pregnane X receptor, respectivement) d'après Edwards (J Lipid Res 2002).*

ABC : ATP binding cassette; Apo : apolipoprotéine; BSEP : bile salt export pump; CETP : cholesteryl ester transport protein ; I-BAPB : ileal bile acid binding protein; LPL : lipoprotéine lipase; PLTP : plasma phospholipid transfer protein; MDR : multidrug resistant protein; MRP : multidrug resistant associated protein; SHP : small heterodimer protein; SREBP : sterol regulatory element-binding protéin

LXR (Liver X Receptor)

Si l'activation du récepteur nucléaire FXR réprime la transcription du CYP7A1, la fixation de l'hétérodimère LXR/RXR sur l'élément de réponse LXRE du promoteur du CYP7A1 active sa transcription (Lehman et coll, 1997). Ces 2 récepteurs nucléaires ont le même partenaire

obligatoire, RXR (Wang et coll, 1999). En présence d'un excès de cholestérol, le LXR agit comme un détecteur de cholestérol et stimule la synthèse de CYP7A1. LXR est également activé par les oxystérols. Ainsi tous les gènes cibles du LXR codent pour des protéines qui ont un rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol et des acides gras dans de nombreux tissus ***(Figure 9)***.

Il existe 2 formes, LXRα et LXRβ qui ont 77% de séquences homologues et qui lient les même oxystérols avec une affinité similaire (Lehman et coll, 1997 ; Janowski et coll, 1999). LXRα est exprimé dans les tissus clés du métabolisme lipidique. Il est présent en plus forte concentration dans le foie (d'où le nom Liver X Receptor) mais on le trouve également dans le rein, l'intestin, la rate, le tissu adipeux, la glande pituitaire et les surrénales (Repa et coll, 1999). Au contraire LXRβ est plus largement exprimé et a été observé dans presque tous les tissus étudiés, dont le foie et le cerveau (Peet et coll, 1998a). Des études de cotransfection ont montré que LXRE situé sur le promoteur du gène CYP7A1 est un élément de réponse plus fort pour LXRα que pour LXRβ (Lehmann et coll, 1997 ; Peet et coll, 1998b). Ainsi la stimulation du CYP7A1 par les oxystérols aurait lieu par l'intermédiaire de LXRα et non pas *via* LXRβ. L'étude de souris déficientes en LXRα (LXRα -/-) a permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle les LXRs sont des régulateurs clés de l'homéostasie du cholestérol. Les souris LXRα -/- ne présentent aucune augmentation compensatrice de la biosynthèse des acides biliaires après un régime riche en cholestérol : le cyp7a1 n'est pas induit par un régime hypercholestérolémiant à la différence des souris sauvages, on observe une accumulation du cholestérol hépatique. Par contre, les souris LXRβ -/- conservent leur résistance naturelle à un régime riche en cholestérol (Alberti et coll, 2001).

De plus, les expressions d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dont SREBP, l'HMGR et l'HMG-CoA synthétase, sont significativement altérées chez les souris LXRα -/- (Peet et coll, 1998b). On élargit cette liste en y ajoutant d'autres gènes sensibles à l'action du LXR et impliqués dans le transport du cholestérol (ABCA1, ApoE, CETP) (Figure 3). Les gènes de la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein), de la LPL (Lipoprotein Lipase) et de l'apolipoprotéine E modulés par le LXR, mais aussi l'apoCII et la PLTP (Plasma Phospholipid Transfer Protein), modulés par FXR, sont impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques ***(Figure 8)***. ABCA1 est également un gène cible de LXR (Fu et coll, 2001), il facilite l'efflux cellulaire des phospholipides et du cholestérol et restreint

l'absorption intestinale de cholestérol. En effet, il a été suggéré que LXR pourrait agir comme un coordinateur du catabolisme du cholestérol et de la synthèse des acides biliaires (Luo et Tall, 2000).

PXR (Pregnane X Receptor)

En 1997, un nouveau récepteur nucléaire orphelin a été cloné chez la souris. Il est activé par les pregnanes (stéroïde C21) naturels ou synthétiques. Il a été ensuite cloné chez l'homme et d'autres espèces animales (Willson et coll, 2001).

PXR, également appelé Pregnenolone-Activated Receptor (PAR) ou Stéroïde X Receptor (SXR) chez l'homme, est un récepteur important dans la régulation du CYP3A, lequel est responsable du métabolisme de plus de 50 % des médicaments connus. (Lehmann et coll, 1998). PXR, tout comme FXR, est un récepteur nucléaire activé par toute une série d'acides biliaires dont l'acide lithocholique. Bien qu'ils soient activés par une série distincte d'acides biliaires, ils sont tous les deux activés par l'acide lithocholique. PXR serait également impliqué dans la répression du CYP7A1 *in vivo* ainsi que dans l'induction du métabolisme de l'acide lithocholique. Ainsi PXR semble jouer un rôle hépatoprotecteur en diminuant la biosynthèse des acides biliaires primaires et en augmentant le métabolisme des acides biliaires secondaires en réponse aux concentrations toxiques d'acide lithocholique (Staudinger et coll, 2001) ***(Figure 9)***.

Par ailleurs, PXR serait activé aussi bien par l'acide lithocholique que par les xénobiotiques. Il entraînerait conjointement l'activation de l'hydroxylation de l'acide lithocholique toxique et l'inhibition du CYP7A1, inhibant la production d'acide lithocholique et augmentant son élimination (Staudinger et coll, 2001). En effet, malgré leurs fonctions physiologiques, les acides biliaires sont potentiellement cytotoxiques lorsqu'ils s'accumulent. Des perturbations de leur transport ou de leur sécrétion peuvent aboutir à divers troubles pathologiques (Hofmann, 1999). Les souris PXR -/- sont viables, fertiles et ne présentent pas de changement manifeste de phénotype. Par contre, elles ont une expression du cyp7a1 diminuée et celle-ci n'est pas sensible à l'action inhibitrice de la cyanoprégnénolone (PCN), un ligand/activateur de PXR (Staudinger et coll, 2001). Ces données confirment le rôle du PXR dans la régulation de l'expression basale du cyp7a1 et sa répression par le PCN.

Des études récentes ont démontré l'implication d'un autre récepteur nucléaire, le PPARα, dans la régulation du métabolisme des acides biliaires (Hunt et coll, 2000). En effet, un traitement par des fibrates engendre une activation du PPARα responsable de la répression de l'activité et de l'expression des CYP7A1 et CYP27A1 ainsi que le CYP8B1, donc de la biosynthèse des acides biliaires (Post et coll, 2001, Hunt et coll, 2000).

CONCLUSION

La capacité de ces récepteurs à être pharmacologiquement modulés en fait des cibles thérapeutiques potentielles. Le métabolisme des acides biliaires étant la principale voie d'élimination du cholestérol chez l'homme, la dérégulation de cette voie de biosynthèse pourrait causer une augmentation du taux de cholestérol. Les progrès récents dans la compréhension du métabolisme des acides biliaires ainsi que sa régulation par les récepteurs nucléaires pourraient conduire à l'identification de plus de déficiences acquises ou congénitales associées à un déséquilibre du métabolisme du cholestérol et des acides biliaires.

Activités du laboratoire

Le laboratoire à Nancy, équipe 4 de l'unité INSERM U525 (Directeur F. Cambien) dirigée par S. Visvikis, Directeur de Recherche à l'INSERM, a pour sujet de recherche « Interaction gènes-environnement et phénotype intermédiaires des maladies cardiovasculaires ». L'objectif général est l'établissement d'un profil génétique composé de plusieurs gènes candidats de risque cardiovasculaires, déterminant le développement de ces maladies. Le travail présenté ici participe au projet d'étudier la variabilité interindividuelle des paramètres du métabolisme lipidique en tenant compte des facteurs régulateurs génétiques et environnementaux.

Mots clés

cholestérol, acides biliaires, cytochrome P450, récepteurs nucléaires

Abréviations :

ABC :	ATP binding cassette ;
Apo :	apolipoprotéine ;
AC :	acide cholique ;
ACDC :	acide chénodéoxycholique ;
BARE :	bile acid response element ;
CYP :	cytochrome P450 ;
FXR :	farnesoïd X receptor ;
HDL :	high density lipoprotein:
LDL :	low density lipoprotein ;
LPL :	lipoprotein lipase ;
LXR :	liver X receptor ;
PLTP :	plasma phospholipid transfer protein ;
PPAR :	peroxysome proliferator-activated receptor ;
PXR :	pregnane X receptor ;
RXR :	retinoïc X receptor ;
SHP :	small heterodimer partner.
SRBI :	scavenger receptor class B type I ;
SREBP :	sterol regulatory element-binding protein ;

Coordonnées du laboratoire :

INSERM U525 (Equipe 4)

Université Henri Poincaré, NANCY 1

30, rue Lionnois

54 000 Nancy, FRANCE

Tel : 33 (0)3 83 68 21 79

Fax : 33 (0)3 83 32 13 22

E-mail : Luc.Ferrari@pharma.uhp-nancy.fr

Remerciements

Les auteurs remercient toutes les personnes qui leurs ont permis d'élaborer leurs travaux de recherche, en particulier le Dr Maâmar Souidi.

Matériel & Méthodes

I. CULTURE CELLULAIRE

Nous avons utilisé une lignée cellulaire hépatique d'origine humaine : les cellules HepG2 (American Type Culture Collection, Maryland) comme modèle cellulaire afin d'étudier les effets des immunosuppresseurs, CsA et RAPA sur le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires.

I.1. Matériel et réactifs

Matériel :

- Plastiques :
  - Flacons de 75 cm^3, (Costar)
  - Plaques (6 ou 96 puits), (Costar)
  - Pipettes (5, 10 et 25 ml), (
  - Tubes Falcon 15 et 50 ml (Costar)
- Cellule de Malassez

Solutions et réactifs :

- Milieu de culture : RPMI 1640 (blanc, sans glutamine, glucose à 2 g/l) (Sigma)
- Antibiotique 100X (10 mg de streptomycine, 25 µg de amphotericine B, 0,9 % de sodium chloride) (Sigma)
- Glutamine 200 mM (Sigma)
- Trypsine EDTA 1X (Sigma)
- Sérum de veau fœtal (SVF) : décomplémenter à 56°C pendant 30 min puis aliquoter par fraction 30 ml. (Boerhinger Mannheim)
- DMSO (Sigma)
- PBS 1X sans Ca^{2+}, sans Mg^{2+} (Eurobio) : 5 g / 500 ml d'eau distillée. Filtrer stérile (0.2µM).
- Cholestérol hydrosoluble (Sigma) : cholestérol méthylcyclodextrine (MβCD)
- Rapamycine (Wyeth Lederle)
- Ciclosporine (Coger)

I.2. Décongélation et amplification cellulaire

Les cellules HepG2 sont cultivées dans un milieu de culture complet RPMI 1640 supplémenté en antibiotiques à 1%, glutamine à 4 mM et sérum de veau fœtal (SVF) à 10%. La mise en culture débute à partir d'ampoules de cellules conservées à l'aide de DMSO (20 %) et de SVF dans l'azote liquide (-196°C). Après décongélation rapide de l'ampoule au bain-marie à 37°C, l'inoculum est prélevé et déposé dans un large volume de milieu de culture complet. Après centrifugation à 800g pendant 5 min, le surnageant contenant le DMSO est éliminé, et le culot cellulaire ainsi formé est resuspendu dans du milieu de culture complet.

Les cellules HepG2 sont cultivées jusqu'à confluence dans des flacons, sous atmosphère à 5 % de CO_2, saturée en vapeur d'eau et à 37°C. L'amplification cellulaire est effectuée une fois la confluence cellulaire atteinte. Après lavage par 5 à 6 ml de PBS, les cellules sont dissociées par trypsination (Trypsine EDTA 1X) puis récupérées dans des tubes Falcon de 50 ml en présence de milieu de culture complet afin d'inhiber la trypsine. Le surnageant est éliminé après centrifugation à 800g puis le culot cellulaire est resuspendu dans un volume adéquat de milieu de culture complet.

I.3.Traitements des cellules

Les traitements sont effectués dans un milieu sans SVF en plaques 6 puits. Pour la mise en plaque des cellules, on procède de la même manière que pour l'amplification. Les cellules sont comptées sur cellule de Malassez puis elles sont diluées de façon appropriée afin d'ensemencer environ 500 000 cellules par puits.

Après confluence des cellules, le milieu de culture est éliminé et remplacé par du milieu sans SVF pendant 24 heures. Après renouvellement du milieu de culture sans SVF, les traitements sont réalisés sur une durée de 24 à 72 heures en milieu sans SVF. Les cellules sont exposées à la rapamycine et/ou à la ciclosporine solubilisées dans l'éthanol en présence ou non de cholestérol (cholestérol MβCD). Afin de ne pas affecter la survie des cellules, la concentration finale en éthanol ne doit pas dépasser 0,1%.

I.4.Récupération des cellules

Après incubation pendant le temps nécessaire (24 à 72 h), le surnageant cellulaire est récupéré en plaque 96 puits et en tubes pour le dosage de LDH (lactate deshydrogénase) et des paramètres lipidiques. Après lavage des cellules dans le PBS, les cellules sont grattées directement dans le tampon de lyse (RNA Instapure) et sont, soit congelées à –20°C, soit utilisées immédiatement pour l'extraction des ARN totaux (cf § 2.1.)

I.5.Dosage de l'activité lactate deshydrogénase (LDH)

La mesure de l'activité LDH permet d'évaluer la toxicité cellulaire engendrée par les différents traitements. En effet, la LDH est une enzyme cytosolique relarguée après lyse

cellulaire. L'activité LDH est mesurée par un test enzymatique (Cytotoxicity Detection Kit, Boerhinger Mannheim) d'après les instructions du fabricant.

II. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

II.1. Extraction d'ARN

Les différentes étapes de ce protocole s'effectuent dans la glace (+4°C) et sont adaptées aux plaques 6 puits.

Après lavage des cellules par 500 µl de PBS par puits, les cellules sont grattées directement avec 400 µl de tampon de lyse (RNA Instapure, Eurogentec). Les cellules sont resuspendues par des aller/retour de pipettes. On ajoute ensuite 300 µl de chloroforme et on agite au vortex pendant 15 sec puis on laisse reposer 5 min dans la glace. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12000 g pendant 15 min et à +4°C. La phase supérieure est alors transférée dans un nouveau tube Eppendorf dans lequel on ajoute un volume équivalent d'isopropanol. Les échantillons sont alors agités et incubés à –20°C pendant 30 min. Après centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4°C, le surnageant est jeté et le culot d'ARN lavé avec 800 µl d'éthanol à 70 %. Les culots d'ARN sont ensuite agités au vortex quelques secondes puis centrifugés à 7500 g pendant 8 min. Le culot d'ARN ainsi formé est séché puis repris dans 50 µl d'eau stérile.

On peut ensuite mesurer la concentration d'ARN par lecture d'absorbance à 260 nm sachant qu'une unité de DO_{260nm} correspond à 40 µg/ml d'ARN. Pour se faire, on prélève 5 µl d'ARN que l'on dilue dans 495 µl d'eau ($D = 1/100^{è}$). Nous avons obtenu en moyenne pour les cellules HepG2, 20 µg d'ARN totaux par puits d'une plaque 6 puits, ces ARN étant de bonne qualité (même rapport $DO_{260/280} > 1,7$).

II.2. RT-PCR

La préparation des échantillons de transcription réverse (RT) et de polymérisation en chaîne (PCR) ainsi que le prélèvement des différents tampons et enzymes se font dans la glace (4°C).

II.2.1. Réverse transcription (RT)

Réactifs et solutions :

- Oligo(dt) 0,25 µg/µl (Promega)
- M-MMLV (Moloney Murine Leukemia virus) (Promega)
- RT (volume réactionnel final de 50µl) : TrisHCl 50 mM, KCl 75 mM, $MgCl_2$ 3 mM, DTT 10 mM, dNTP 1 mM (Promega), 40 unités de RNAsine (Promega), 0,5µl de BSA 100X (Sigma), 200 unités de M MLV-RT, 1µl d'oligo(dt)

Protocole :

Cinq µg d'ARN extraits à partir de cellules HepG2 sont chauffés 5 min à 65°C avec 5 ng/µl d'oligo(dt). La transcription réverse est alors effectuée pendant 2 heures à 37°C suivi d'une inactivation par la chaleur de la MMLV-RT pendant 2 min à 94°C. Le stockage des produits de RT est effectué à –80°C.

II.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) - *i-Cycler® (BioRad)*

Les PCR utilisant des amorces de GAPDH, ARNr 18S, CYP7A1, CYP27A1, HMGR, SR-BI et PXR sont effectuées individuellement dans un thermocycler (i-Cycler, BIORAD). Les ARNm de GAPDH ou d'ARNr 18S sont utilisés comme étalons internes afin de corriger les différences de concentration d'ADNc obtenues après la transcription réverse.

Réactifs et solutions :

- PCR (volume réactionnel final de 50 µl) : TrisHCl 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTP 200µM (Promega), amorces (Eurogentec) 0,3 à 1 µM selon le gène (cf Tableau 1), 2,5 unités de Taq DNA polymérase (Quantum Appligène), 2 µl de produit de RT
- Oligonucléotides (Eurogentec) 100µM : solubilisées dans l'eau stérile et conservées à –20°C
- Gel d'agarose (Eurobio) 1 % (200 ml). Migration à 80 V pendant 30 minutes
- Bromure d'éthidium (Prolabo) : solution aqueuse 1%

Matériel :

- Thermocycler 96 puits (iCycler, BioRad)
- Appareil photo numérique Kodak DC290. Logiciel d'analyse densitométrique (K1D, Kodak®).

Conditions d'amplifications

Dénaturation.....	94°C – 5 min
Ajout de la Taq polymérase	72°C – 1 min
Amplification	
Dénaturation.....	94°C – 1 min
Hybridation.....	54° – 58°C – 1 min
Extension.....	72°C – 1 min
Extension finale.....	72°C – 5 min

Les échantillons sont stockés à +4°C à court terme et à –20°C à long terme. Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose puis quantifiés à l'aide d'un logiciel d'analyse densitométrique. Les résultats sont exprimés par rapport à la GAPDH ou l'ARNr 18S.

***Tableau 6**: Séquences des amorces et conditions d'amplification par PCR (iCycler®)*

Gènes		Séquences	T° hybridation	Nbre de cycles	Amorces	Références
GAPDH	S	CCATCACCATCTTCCAGGAG	54°C	29	0,4 µM	Andreou 1998
	AS	GGATGATGTTCTTCCAGGAG				
18S	S	GTAACCCGTTGAACCCCATT	54°C	27	0,3 µM	Schmittgen 2000
	AS	CCATCCAATCGGTAGTAGCG				
HMGR	S	GCAGCACAGAATGTTGGTAG	55°C	32	0,5 µM	Shoda 1995
	AS	GGATGATGTTCTGGAGAGCC				
CYP 27A1	S	GAGATCCAGGAGGCCTTGCACGA	56°C	30	0,5 µM	Garuti 1996
	AS	CCCAGCAAGGCGGAGACTCA				
CYP 7A1	S	GCATCATAGCTCTTTACCCAC	56°C	32	0,5 µM	Adreou 1998
	AS	GGTGTTCTGCAGTCCTGTAAT				
SR-BI	S	CGTCGCCGTCCCCGTCTCCTGCCAG	61°C	38	1 µM	Xu 2001
	AS	CTTAAGGACCTGCTGCTTGATGAGC				
PXR	S	CAAGCGGAAGAAAAGTGAACG	54°C	38	1 µM	Dotzlaw 1999
	AS	CTGGTCCTCGATGGGCAAGTC				

II.2.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) - *LightCycler® (Roche)*

Contrairement à la PCR classique (i-Cycler) qui autorise uniquement une quantification en point final, ce thermocycler permet la visualisation en temps réel de l'amplification des

produits de PCR. La quantification s'effectue au début de la phase exponentielle d'amplification.

Matériel et Réactifs :

- LightCycler® (Roche)
- Capillaires pour LightCycler (Roche)
- Kit SYBR Green (Roche) contenant :
  - Tube 1a : Taq DNA polymerase (hot-start resistant)
  - Tube 1b : tampon réactionnel, dNTP, SYBR Green I, $MgCl_2$ 10mM
  - Tube 2 : $MgCl_2$
  - Tube 3 : H_2O sterile
- Oligonucléotides (Eurogentec) 100µM : solubilisés dans l'eau stérile et conservées à –20°C

Protocole :

Une gamme de concentration (dilution 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000) est effectuée à partir de produit de RT témoin.
Les tubes 1a et 1b sont mélangés et stockés à 4°C. On prépare ensuite un mélange contenant pour chaque tube :
- 11,6 µl d'eau stérile
- 2,4 µl de $MgCl_2$ (concentration finale de 4 mM)
- 2 µl d'amorces (mélange équimolaire d'amorces Sens et AntiSens)
- 2 µl de SYBR Green I

Pipetter 18 µl de mélange dans les capillaires et ajouter 2 µl de produit de RT préalablement dilué (1/80). Les capillaires sont ensuite centrifugés et placés dans le LightCycler (Figure 1)

Conditions d'amplifications

Dénaturation.....	5°C 8 min
Amplification	
Dénaturation.....	95°C 10 sec
Hybridation.....	54° – 58°C 5 sec
Extension.....	72°C 10-15 sec
Courbe de fusion	
Etape 1.....	95°C 10 sec
Etape 2.....	60°C 15 sec
Etape 3.....	60→ 95°C (0,05°C/sec)
Refroidissement.....	95→ 40°C (20°C/sec)

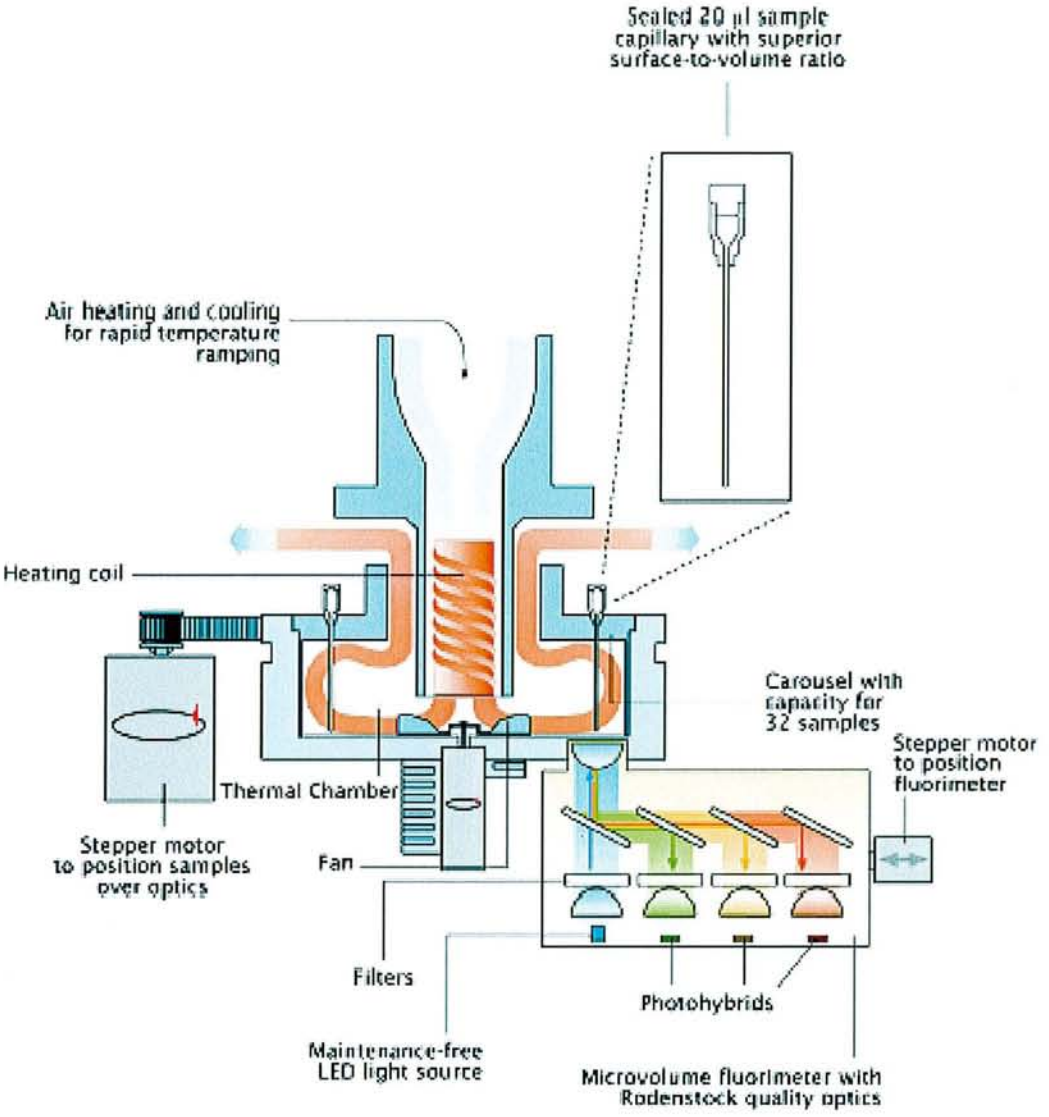


Figure 10: Schéma du LightCycler (d'après LightCycler Operator's Manual, Roche)

Tableau 7 *: Séquences des amorces et conditions d'amplification par PCR (LightCycler®)*

Gènes		Séquences	T° hybridation	Temps d'élongation	Amorces	Références
GAPDH	S	CCATCACCATCTTCCAGGAG	54°C	15 sec	0,3 µM	Andreou 1998
	AS	GGATGATGTTCTTCCAGGAG				
18S	S	GTAACCCGTTGAACCCCATT	54°C	8 sec	0,2 µM	Schmittgen 2000
	AS	TGTCCAGTCCAGTAATGGTTCTGT				
LXRα	S	AGAGGAGGAACAGGCTCATGC	56°C	8 sec	0,4 µM	Fu 2001
	AS	AAAGGAGCGCCGGTTACACT				
ABC 1	S	TGTCCAGTCCAGTAATGGTTCTGT	56°C	5 sec	0,3 µM	Fu 2001
	AS	AAGCGAGATATGGTCCGGATT				
LDL-R	S	CTCAAGCATCGATGTCAATG	58°C	15 sec	0,4µM	Shoda 1995
	AS	AGCTCTGGCAGGCAATGCT				

Les résultats sont exploités directement à partir du logiciel LightCycler. La détection des produits de PCR en temps réel se fait grâce à la fixation de fluorophores sur les doubles brins d'ADN. L'excitation maximum de SYBR Green I est de 497 nm alors que l'émission maximum de l'ADN marqué a lieu à 521 nm (**Figure 10**).

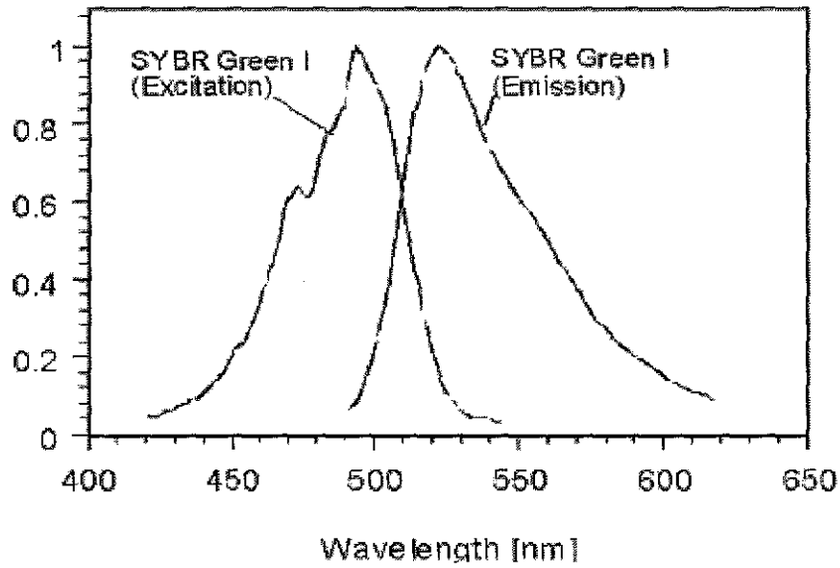


Figure 11 *: Longueurs d'ondes d'émission et d'excitation du fluorophore SYBR Green I*

III. METHODES BIOCHIMIQUES

III.1. Séparation subcellulaire

Réactifs et solutions :

- Tampon d'homogénéisation : KH_2PO_4 50 mM, Saccharose 300 mM, Dithiothreitol (DTT) 0,5 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM
- Tampon de conservation : Tris 10mM, EDTA 0,1mM, Glycérol 23 % (v/v)
- PBS 1X sans Ca^{2+}, sans Mg^{2+} (Eurobio): 5 g / 500 ml d'eau distillée. Filtrer stérile.

Matériel :

- Ultracentifugeuse TL100 (Beckman)
- Tubes pour ultracentrifugeuse
- Centrifugeuse GS-15R (Beckman)
- Dounce

Protocole :

Les opérations suivantes sont effectuées dans la glace pour éviter toute altération enzymatique éventuelles.

Matériel et Tampons	Action	Durée
Flacons de cellules HepG2 + PBS 1X (4°C)	Cellules grattées et récupérées dans des tubes Eppendorf	
	Centrifugation 800 g	5 min
Tampon d'homogénéisation	Resuspension et homogénéisation des culots cellulaires à l'aide d'un dounce.	
	Sonication	10 sec
Homogénat cellulaire	Centrifugation 20 000 g (4°C)	25 min

A partir de cette étape de centrifugation le surnageant et le culot obtenus sont séparés pour les préparations respectives des microsomes et des mitochondries.

III.1.1. Préparation des microsomes

Matériel et Tampons	Action	Durée
Surnageant	Ultracentrifugation 100 000 g (4°C)	1 h
Culots de microsomes + tampon d'homogénéisation	Resuspension à l'aide d'une pipette par aspiration / refoulement	
Tampon d'homogénéisation	Ultracentrifugation 100 000 g (4°C)	1 h
Tampon de conservation	Resuspension à l'aide d'une dounce	
	Aliquoter dans des tubes Eppendorf et conserver à – 80°C	

III.1.2. Préparation des mitochondries

Matériel et Tampons	Action	Durée
Culot 20 000 g + Tampon d'homogénéisation	Resuspension avec une pipette par aspiration / refoulement	
	Homogénéisation à l'aide d'un dounce	
Homogénat de mitochondries	Centrifugation 20 000 g (4°C)	10 min
Surnageant	Centrifugation 9 000 g	10 min
Tampon de conservation	Resuspension à l'aide d'une pipette	
	Aliquoter dans des tubes Eppendorf et conserver à – 80°C	

La concentration en protéines (microsomes et mitochondries) est dosée par la méthode de Lowry.

Les microsomes et les mitochondries sont conservés à – 80 °C après avoir été aliquotés par fraction de 200 µl.

III.2. Dosage de protéines

Principe :

Le dosage est effectué selon la méthode de Lowry (Lowry et coll, 1951). Cette méthode met en jeu 2 réactions : (1) en milieu alcalin (méthode du biuret) les ions Cu^{2+} se lient aux liaisons

peptidiques et les complexes formés produisent une coloration violette (2) le réactif de Folin réagit avec les acides aminés aromatiques de la cystéine. L'intensité de la coloration est lue à 660 nm.

Réactifs et tampons :

- Solution de BSA à 2 g/l
- Réactif de Folin-Ciocalteau : diluer extemporanément au ¼ dans H_2O
- Solution alcaline de Tartrate (qsp 1 L) :
  Tartrate de sodium et de potassium .....0,25 g
  Carbonate de sodium.....10 g
  Hydroxyde de sodium.....4 g
- Sulfate de cuivre 0,1 % 0,1 g / 100 ml
- Solution alcaline de cuivre : à préparer extemporanément
  Solution de tartrate.....9 ml
  Sulfate de cuivre.....1 ml

Protocole :

Une gamme d'étalonnage (0 à 0,4 g/l) est réalisée à partir de la solution de BSA 2 g/l.

- Déposer les échantillons et les points de gamme (20µl) préalablement dilués dans la plaque.
- Ajouter 160 µl de la solution alcaline de cuivre
- Incuber 30 min à température ambiante
- Ajouter 20µl de Folin-Ciocalteau dilué au ¼
- Incuber à l'obscurité pendant 30 min
- Lire l'absorbance à 660 nm sur lecteur de microplaques (Power Wave X, BIO-TEK instrument)

III.3. Dosage de paramètres lipidiques

III.3.1. Dosage des triglycérides

La détermination des triglycérides (TG) se fait à l'aide de méthodes enzymatiques (Boerhinger Mannheim) qui reposent sur deux étapes :

- hydrolyse des TG en glycérol par des lipases
- dosage du glycérol par la glycérol kinase

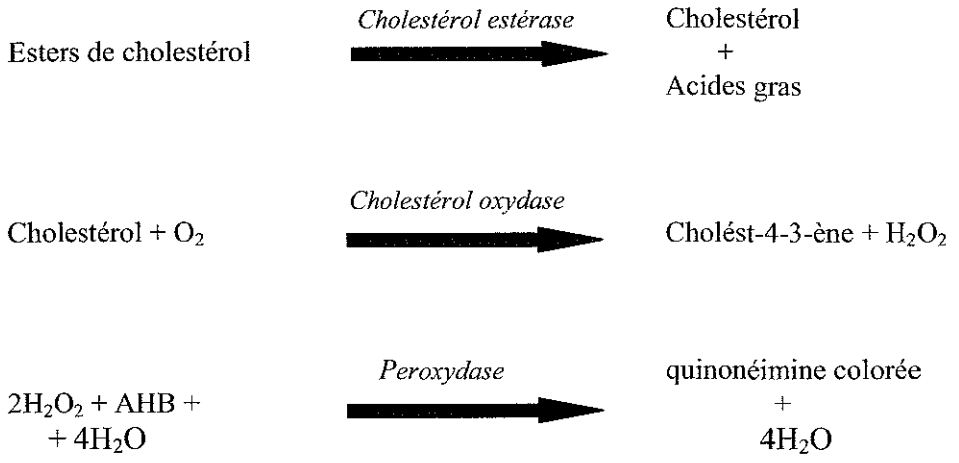
Protocole :

Une gamme d'étalonnage (0 à 12 mM) est réalisée à partir d'une solution de glycérol 12 mM.

- Déposer les échantillons et les points de gamme (20 µl) dans la plaque
- Ajouter 200 µl de la solution réactionnelle
- Incuber 10 min à température ambiante
- Lire l'absorbance à 500 nm dans un délai de 60 min

III.3.2. Dosage du cholestérol

La détermination de la concentration en cholestérol est effectuée à l'aide d'une méthode enzymatique (Sigma diagnostics) qui repose sur trois étapes :



Protocole :

Une gamme d'étalonnage (0 à 6 g/l) est réalisée à partir d'une solution de sérum étalon.

- Déposer les échantillons et les points de gamme (20 µl) dans la plaque
- Ajouter 200 µl de la solution réactionnelle
- Incuber 15 min à température ambiante (5 min à 37°C)
- Lire l'absorbance à 500 nm et 660 nm

III.3.4. Dosage des apolipoprotéines AI, B100, CIII et E

Ces dosages sont effectués par des méthodes automatisées sur AU 5021 (Olympus Merck), Cobas Mira (Roche) et BNA (Behring).

Auparavant les surnageants cellulaires ont été concentrés (au moins 6 fois) par centrifugation à 3000 g à l'aide de Centriplus 10 (Millipore) afin d'obtenir des concentrations d'apolipoprotéines détectables dans ces milieux de cultures.

***Tableau 9**: Dosage des apolipoprotéines*

	Cobas Mira		**BNA**	
Dosages	ApoE	ApoCIII	ApoAI	ApoB
Méthodes	Immunoturbidimétrie		Immunonéphélométrie	
Réactifs	Roche		Behring	

IV. DOSAGES D'ACTIVITES ENZYMATIQUES

IV.1. Dosage des enzymes du métabolisme des acides biliaires

Le dosage des trois activités enzymatiques du métabolisme des acides biliaires, décrites ci-dessous, sont réalisés selon des méthodes radioisotopiques mises au point au laboratoire de Physiologie de la Nutrition (Orsay, Paris XI) dirigé par le Professeur C. Lutton.
Auparavant, les échantillons de microsomes ou de mitochondries sont préincubés pendant 30 min à +37°C en présence des immunosuppresseurs, CsA et RAPA, ou de DMSO (Témoin) à une concentration ne dépassant pas 1% (v/v).

IV.1.1. Dosage de la stérol 27-hydroxylase
(Souidi et coll, 1999)

Principe :

L'enzyme clé de la voie acide du métabolisme des acides biliaires, la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) est située dans la membrane mitochondriale. A partir de préparations de mitochondries de cellules HepG2, le cholestérol marqué incorporé dans HPβCD (hydroxybéta cyclodextrine) est transformé en 27-hydroxycholestérol selon un rendement proportionnel à l'activité de cette enzyme.

Matériel :

- Plaques TLC sur gel de silice (Sigma Aldrich)
- Compteur à scintillation MR300 (Kontron)
- Fioles de comptages (Packard)

Réactifs et solutions :

- Tampon phosphate de potassium (pH 7,4) 75 mM, EDTA 1mM, DTT 0,5 mM, $MgCl_2$ 5mM
- Cholestérol froid (Sigma) : 1,4 mM
- Cholestérol 4-^{14}C (NEN Perkin Elmer) : 40 µCi/ml
- HPβCD 45 % filtré stérile (filtre 0,2 µm)
- Solution dichlorométhane (CH_2Cl_2) / éthanol (EtOH) 5/1 (v/v)
- Solution standard de 27-hydroxycholestérol : 2,5 mg/ml méthanol
- Solution standard de cholestérol (2,5 mg/ml CH_2Cl_2)
- Solution de dichlorofluorescéine (Sigma) 0,2 % (p/v) dans méthanol
- NADPH (Sigma) 10 mM dans tampon phosphate de potassium
- Isocitrate de sodium (Sigma) (10 mM) dans Tampon phosphate de potassium
- Isocitrate déshydrogénase (Sigma) (0,2 U / échantillon)
- HCl et NaOH 5N
- Liquide scintillant (Packard)

Protocole :

Le dosage de l'activité est réalisé à partir de 200 à 250 µg de protéines mitochondriales mises en présence de 0,5µCi de cholestérol 4-^{14}C (10 nmol) et de 16 nmoles de cholestérol solubilisé dans une solution d'HPβCD à 45 % (v/v). La réaction proprement dite est ensuite déclenchée par l'addition de NADPH 1 mM au milieu d'incubation contenant 5 mM d'isocitrate de Na et 0,2 U de isocitrate déshydrogénase. L'incubation est poursuivie dans les mêmes conditions pendant 6 minutes. La réaction est arrêtée par l'addition de 40 µl de NaOH 5N et du même volume d'HCl 5N ; 4,3 ml d'un mélange d'extraction (CH_2Cl_2, 5/1, v/v) et 1,2 ml d'eau distillée sont ajoutés, les tubes sont vortexés durant 1 min. Les phases organiques sont recueillies et évaporées. Les stérols sont repris dans 200 µl de CH_2Cl_2 auxquels sont ajoutés les standards (cholestérol et 27-hydroxycholestérol). Ce mélange est déposé sur plaque de gel de silice. Après migration par un solvant constitué d'acétate d'éthyle et d'hexane (1/1, v/v), la présence de 27-hydroxycholestérol et de cholestérol est révélée par vaporisation d'une solution méthanolique contenant 2% de dichlorofluorescéine. Puis les taches sont découpées séparément et transférées dans des fioles de comptage. La radioactivité est comptée par un compteur à scintillation.

IV.1.2. Dosage de la cholestérol 7α-hydroxylase
(Souidi et coll, 1998)

Principe :

L'enzyme clé de la voie neutre du métabolisme des acides biliaires, la cholestérol 7α-hydroxylase (CYP7A1) est située dans la membrane microsomale. A partir de préparations de microsomes de cellules HepG2, le cholestérol marqué apporté par HPβC est transformé en 7α-hydroxycholestérol selon un rendement proportionnel à l'activité de l'enzyme.

L'utilisation d'un système générateur NADPH (G6P + G6PDh $NADP^+$ dépendant) empêche l'accumulation de $NADP^+$ et donc la consommation de 7α-hydroxycholestérol par la stérol oxydoréductase également présente dans les membranes microsomales.

Matériel :

- Plaques TLC sur gel de silice (Sigma Aldrich)
- Compteur à scintillation MR300 (Kontron)
- Fioles de comptages (Packard)

Réactifs et solutions :

- Tampon phosphate de potassium (pH 7,4) 75 mM, EDTA 1mM, DTT 0,5 mM, $MgCl_2$ 5 mM
- Cholestérol froid (Sigma) : 1,4 mM
- Cholestérol 4-^{14}C (NEN Perkin Elmer) : 40 µCi/ml
- HPβCD 45 % filtré stérile (filtre 0,2 µm)
- Solution dichlorométhane (CH_2Cl_2) / éthanol (EtOH) 5/1 (v/v)
- Solution standard de 7α7β-hydroxycholestérol : 2,5 mg/ml méthanol
- Solution standard de cholestérol (2,5 mg/ml CH_2Cl_2)
- Solution de dichlorofluorescéine (Sigma) 0,2 % (p/v) dans méthanol
- NADPH (Sigma) 10 mM dans tampon phosphate de potassium
- Glucose-6-phosphate (Sigma) (10 mM) dans Tampon phosphate de potassium
- Glucose-6-phosphate déshydrogénase (Sigma) (0,2 U / échantillon)
- HCl et NaOH 5N
- Liquide scintillant (Packard)

Protocole :

Le dosage de cette activité est réalisé à partir de 200 à 250 µg de protéines microsomales mises en présence de 0,5µCi de cholestérol ^{14}C et de 26 nmoles de cholestérol solubilisé dans une solution d'HPβCD à 45 % (v/v). La réaction proprement dite est ensuite déclenchée par l'addition de NADPH 1 mM au milieu d'incubation contenant 10 mM de glucose-6-phosphate et 2 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase. L'incubation est poursuivie dans les mêmes conditions pendant 6 minutes. La réaction est arrêtée par l'addition de 40 µl de NaOH 5N et du même volume d'HCl 5N ; 4,3 ml d'un mélange d'extraction (dichlorométhane/éthanol, 5/1, v/v) et 1,2 ml d'eau distillée sont ajoutés, les tubes sont vortexés durant 1 min.. Les phases organiques sont recueillies et évaporées. Les stérols sont repris dans 200µl de dichlorométhane auxquels sont ajoutés des standards (cholestérol et mélange 7α et 7β-hydroxycholestérol) ; le mélange est déposé sur plaque de gel de silice. Après une double migration par un solvant constitué d'acétate d'éthyle et d'hexane (1/1, v/v), les taches de 7α-hydroxycholestérol et de cholestérol sont révélées par vaporisation d'une solution méthanolique contenant 2% de dichlorofluorecéine, découpées séparément et transférées dans des fioles de comptage. La radioactivité est comptée par un compteur à scintillation.

IV.1.3. Dosage de l'oxystérol 7α-hydroxylase
(Souidi et coll, 2000)

Principe :

L'oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1) est une enzyme clé de la voie acide du métabolisme des acides biliaires. A partir de préparations de microsomes de cellules HepG2, le 25-

hydroxycholestérol marqué (26,27-^{3}H) apporté par HPβCD est transformé en 7α-25-dihydroxycholestérol selon un rendement proportionnel à l'activité de l'enzyme. L'utilisation d'un système générateur NADPH (G6P + G6PDh $NADP^+$ dépendant) empêche l'accumulation de $NADP^+$ et donc la consommation de 7α-25-dihydroxycholestérol par la stérol oxydoréductase également présente dans les membranes microsomales.

Matériel :

- Plaques TLC sur gel de silice (Sigma Aldrich)
- Compteur à scintillation MR300 (Kontron)
- Fioles de comptages (Packard)

Réactifs et solutions :

- Tampon phosphate de potassium (pH 7,4) 75 mM, EDTA 1mM, DTT 0,5 mM, $MgCl_2$ 5 mM
- 25-hydroxycholestérol froid 1,4 mM
- 25-[26,27-^{3}H]-hydroxycholestérol 1 mCi/ml (NEN Perkin Elmer)
- HPβCD 45 % filtré stérile (0,2 µm)
- Solution CH_2Cl_2 / EtOH 5/1 (v/v)
- Solution standard de 25-hydroxycholestérol (2,5 mg/ml méthanol)
- Solution standard de 7α et 7β-hydroxycholestérol (2,5 mg/ml CH_2Cl_2)
- Solution de dichlorofluorescéine 0,2 % (p/v) dans méthanol
- NADPH 10 mM dans tampon phosphate de K
- Isocitrate de Na dans TR (10 mM)
- Isocitrate de Na (0,2 U / échantillon)
- HCl et NaOH 5N

Protocole :

Le dosage de cette activité est réalisée à partir de 200 à 250 µg de protéines microsomales mises en présence de 0,5µCi de 25-[26,27-$^3H_2$]hydroxycholestérol et de 26 nmoles de 25-hydroxycholestérol, solubilisé dans une solution d'HPβCD à 45 % (v/v). Les échantillons de microsomes sont préincubés pendant 30 min à 37°C en présence des immunosuppressueurs, CsA et RAPA ou de DMSO. La réaction proprement dite est ensuite déclenchée par l'addition de NADPH 1 mM au milieu d'incubation contenant 10 mM de glucose-6-phosphate et 6 U de glucose-6-phosphate deshydrogénase. L'incubation est poursuivie dans les mêmes conditions pendant 6 minutes. L'arrêt de la réaction se fait par addition de 40µl de NaOH 5N. Après neutralisation par l'addition de 40 µl d'HCl; 2 ml d'un mélange d'extraction (méthanol/chloroforme, 2/1, v/v) sont ajoutés et l'ensemble est vortexé, puis 2 ml de cholroforme et 1,5ml d'eau distillée sont ajoutés. Les tubes sont vortexés durant 1 min, 200 µl des phases organiques sont prélevés et déposés sur plaque de gel de silice ainsi que des

standards (7α-hydroxycholestérol, 7β-hydroxycholestérol et le 25-hydroxycholestérol). Après une migration par dans solvant constitué d'acétate d'éthyle et d'hexane (3/2, v/v), les taches de 7α-hydroxycholestérol et de 25-hydroxycholestérol sont révélées par vaporisation d'une solution méthanolique contenant 2% de dichlorofluorescéine. Les zones correspondant au 7α,25-dihydroxycholestérol, zone comprise entre le dépôt et la tache 7α-hydroxycholestérol, et celle du 25-hydroxycholestérol sont délimitées et découpées séparément et transférées dans des fioles de comptage. La radioactivité est évaluée par une compteur à scintillation.

IV.2. Dosage de l'activité HMG-CoA réductase

(Méthode modifiée de Phillip et Shapiro, 1979)

Principe :

L'HMGR est une enzyme importante du métabolisme du cholestérol située dans l'HMG-CoA en acide mévalonique, en présence de NADPH. En présence d'HMG-CoA marqué (^{14}C), l'acide mévalonique formé est transformé en mévalonolactone (^{14}C) en conditions acides puis séparé sur une colonne échangeuse d'ions.

Matériel :

- Compteur à scintillation MR300 (Kontron)
- Fioles de comptages (Packard)le réticulum endoplasmique des cellules. Elle catalyse la transformation de
- Colonne de résine AGX-18, ions formatés (Bio-Rad)

Réactifs et solutions :

- Tampon 1 : phosphate de potassium (pH 7,4) 75 mM, EDTA 1mM, , $MgCl_2$ 5 mM, DTT 10 mM
- Tampon 2 : phosphate de potassium (pH 7,4) 75 mM, EDTA 1mM, , $MgCl_2$ 5 mM, DTT 23 mM
- Phosphatase alcaline (Sigma) 0,5 U / tube
- [glutaryl-3-^{14}C]HMG-CoA 20 µCi/ml (NEN Perkin Elmer)
- HMG-CoA tiède 19,6 nmol HMG-CoA dont 1 nmol chaud (125000 dpm) et 18,6 nmol de froid.
- NADPH (Sigma) : 28 mM dissous dans le tampon 1
- [5-^{3}H]Mévalonolactone 1 mCi/ml : 10000 dpm / tube (20µl)
- HCL 5N

Protocole :

De la même façon que pour les dosages des enzymes du métabolisme des acides biliaires, les microsomes sont tout d'abord incubés pendant 30 min en présence des immunosuppresseurs CsA et RAPA ou de DMSO (témoin). L'enzyme est activée par déphosphorylation grâce à une incubation d'une heure à +37°C en présence de phosphatase. Le substrat (HMG-CoA ^{14}C)

est ajouté et la réaction déclenchée par l'addition de son coenzyme : le NADPH. Après une incubation de 20 min à +37°C et sous agitation, le produit de la réaction (l'acide mévalonique) est transformé en mévalonolactone en conditions acides (ajout d'HCl). La séparation de l'HMG-CoA ^{14}C non transformé et la mévalonolactone ^{14}C produite par la réaction enzymatique est réalisée par chromatographie sur colonne composée d'une résine basique échangeuse d'ions (AG1X8, Bio-Rad). La mévalonolactone ^{14}C est éluée à l'eau, l'HMG-CoA ^{14}C restant sur la colonne. Des « blancs » contenant des microsomes bouillis, c'est à dire ayant perdu toute activité enzymatique, sont traités de la même manière afin d'évaluer le bruit de fond qui est soustrait de la radioactivité ^{14}C présente dans les échantillons. Le rendement de chaque colonne est évalué grâce à un marqueur interne (la mévalonolactone ^{3}H) en fin du dosage.

Résultats & Discussion

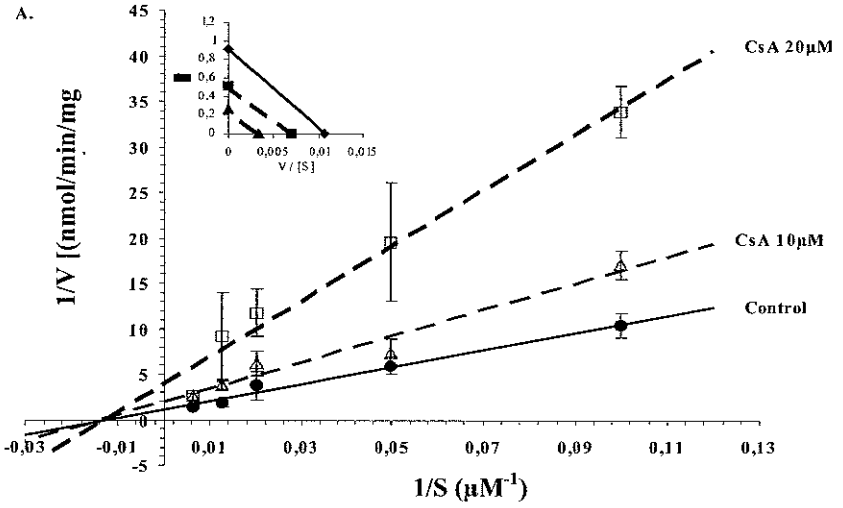
I. Inhibition de l'activité CYP27A1 (stérol 27-hydroxylase) par la ciclosporine A et la rapamycine dans les mitochondries de cellules HepG2 - Effets sur l'expression de l'HMG-CoA réductase (Publication 1)

Nous avons débuté ce travail par le dosage de différentes activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme du cholestérol. Comme nous l'avons vu en introduction, la biosynthèse des acides biliaires a pour substrat le cholestérol et c'est la principale voie d'élimination du cholestérol. Les P450 sont les enzymes clés de cette voie de biosynthèse et plus particulièrement les CYP7A1 et CYP27A1 qui sont les enzymes initiatrices et donc limitantes de la dégradation du cholestérol. L'ACDC est le principal acide biliaire produit par les cellules HepG2 (Everson et Polokoff, 1986). Ainsi, les CYP7A1 et CYP8B1 qui conduisent préférentiellement à la formation d'acide cholique ont une activité très faible dans cette lignée cellulaire d'origine hépatique (Javitt, 1994 ; Levy et coll, 1994 ; Hassan et coll, 1992). L'activité CYP7A1 dans les cellules HepG2 correspond à environ 2 % de celle estimée dans le foie humain normal (Erickson et Fielding, 1986) et il a été suggéré que la voie de la stérol 27-hydroxylase était particulièrement importante dans des conditions de faible activité CYP7A1 (Princen et coll, 1991). Ainsi la diminution de la synthèse des acides biliaires en présence de CsA serait due à l'inhibition de la CYP27A1.

D'après les différents travaux ayant rapporté l'effet inhibiteur de la CsA sur l'activité du CYP27A1 (Princen et al, 1991 ; Winegar et al, 1996 ; Souidi et al, 1999) et partant de l'hypothèse que la diminution du taux de 27-hydroxycholestérol qui en découle serait responsable d'une diminution du rétrocontrôle négatif sur la biosynthèse du cholestérol et en particulier sur l'HMGR (Axelson et Larsson, 1995 ; Babiker et al, 1997 ; Zhang et al, 1997), nous avons comparé les effets de la CsA et de la RAPA sur l'activité CYP27A1 et sur l'expression de l'HMGR.

Dans un premier temps, nous avons étudié, *in vitro*, l'effet de ces immunosuppresseurs sur l'activité CYP27A1 à partir de mitochondries de cellules HepG2 (***Figure 12***). La CsA est un puissant inhibiteur de l'activité CYP27A1 (Ki = 10.5µM) en accord avec ce qui a été observé par ailleurs (Winegar et al, 1996 ; Dählback-Sjöberg et al, 1993) alors que la RAPA inhibe

faiblement l'activité CYP27A1 (Ki = 111.5µM). De plus les mécanismes d'inhibition impliqués seraient différents, respectivement compétitif et non compétitif pour la CsA et la RAPA. Jusqu'à présent seul l'effet de la CsA sur les enzymes du métabolisme des acides biliaires a été étudié, notamment le CYP27A1. Nous démontrons pour la première fois l'effet inhibiteur de la RAPA sur l'activité CYP27A1. Cet effet des immunosuppresseurs sur la synthèse des acides biliaires est analogue à celui ayant lieu chez les personnes souffrant de xanthomatose cérébrotendineuse. La CsA, notamment, est responsables d'une diminution de la biosynthèse des acides biliaires et plus particulièrement de l'acide chénodéoxycholique (Levy et coll, 1994).



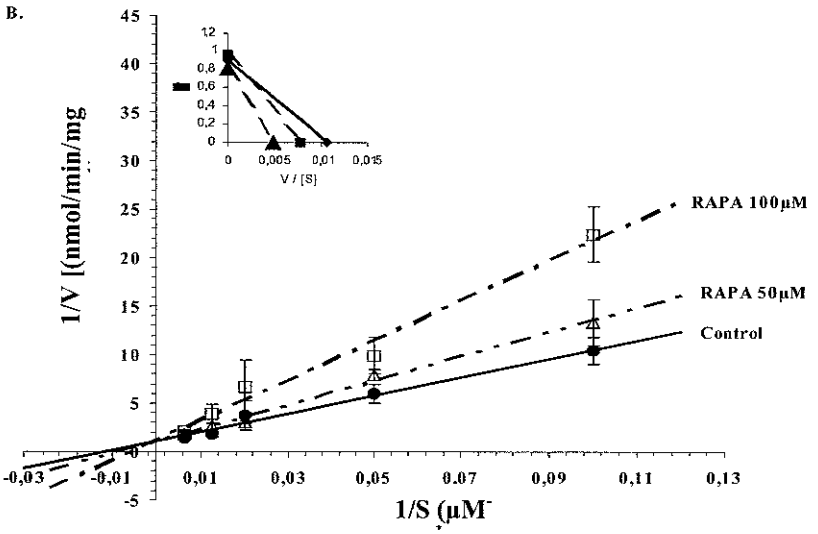


Figure 12 *: Inhibition de l'activité CYP27A1 dans les mitochondries de cellules HepG2 par la CsA ou la RAPA. La concentration finale de cholestérol varie de 10 à 160 µM. Ces graphiques montrent les courbes de Lineweaver-Burk permettant la détermination des cinétiques enzymatiques en présence ou en absence de CsA ou de RAPA.*

La transformation de l'HMG-CoA en mévalonate par l'HMGR est une étape clé et limitante de la biosynthèse du cholestérol. La diminution de son activité cellulaire par un rétrocontrôle négatif de son expression permet de réduire la synthèse endogène de cholestérol. Les oxystérols sont des répresseurs plus importants de la biosynthèse du cholestérol que le cholestérol lui-même. Dans cette étude, et conformément à notre hypothèse de départ, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'HMGR par les cellules HepG2 après traitement par la CsA ou la RAPA. Cette sur-expression serait due à la diminution du rétrocontrôle par les oxystérols et en particulier le 27-hydroxycholestérol du fait de l'inhibition de l'activité CYP27A1 par ces immunosuppresseurs. Ces expériences ont été réalisées en présence de cholestérol administré aux cellules à l'aide d'une cyclodextrine permettant sa solubilisation. Dans un premier temps, les traitements par les immunosuppresseurs ont été réalisés uniquement dans un milieu sans sérum donc sans cholestérol, et aucune variation de l'expression de l'HMGR n'a été observée. Nous avons constaté que, dans ces conditions, l'HMGR était surexprimée et émis l'hypothèse que ce fait est provoqué par la carence en cholestérol et l'absence de rétrocontrôle négatif par les oxystérols et le 27-hydroxycholestérol en particulier. Ainsi les immunosuppresseurs n'entraînent pas de modification de l'expression de l'HMGR. A l'inverse, en présence de cholestérol, l'expression de l'HMGR est faible et l'addition des immunosuppresseurs dans le milieu de culture limiterait alors le rétrocontrôle négatif exercé par le 27-hydroxycholestérol sur l'expression de l'HMGR aboutissant à une augmentation dose-dépendante de son expression (***Figure 13***).

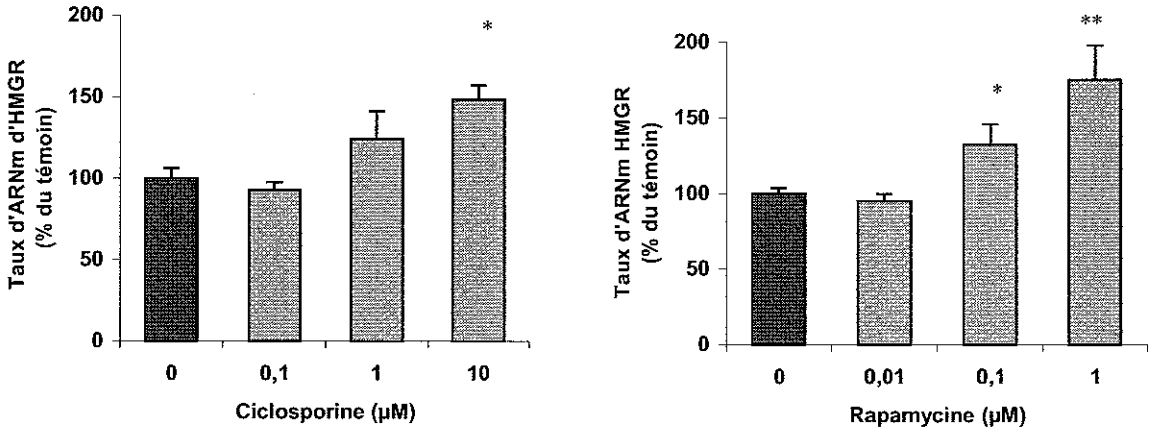


Figure 13 *: Effets de la CsA ou de la RAPA en présence de cholestérol (100µM) sur l'expression de l'HMGRα par les cellules HepG2*
**p<0.05, **p<0.01, significativement différent du groupe témoin par le test de Student*

Des expériences effectuées chez la souris démontrent également une augmentation de l'expression de l'HMGR ainsi que de la squalène synthase en présence de CsA (Wu et coll, 1999b) associée à une augmentation de la concentration plasmatique du cholestérol et des triglycérides. En effet pour Tamasawa et coll (1997), la diminution du taux d'oxystérols pourraient débloquer l'effet inhibiteur sur l'activité HMGR et conduire à une activation de cette enzyme dans le foie de rat.

En conclusion, l'inhibition de CY27A1 par la CsA ou la RAPA aboutirait non seulement à un catabolisme diminué du cholestérol mais aussi à une augmentation de sa synthèse liée à l'augmentation d'expression de l'HMGR.

PUBLICATION N°1

Rapamycine is a weak inhibitor of CYP27A1 (sterol 27-hydroxylase) activity in HepG2 mitochondria

GUEGUEN Y, FERRARI L, SOUIDI M, BATT A-M, LUTTON C, SIEST G AND VISVIKIS S.

Life Sciences (soumise)

Rapamycin is a weak inhibitor of CYP27A1 (sterol 27-hydroxylase) in HepG2 cells

Yann GUEGUEN[1], Luc FERRARI[1]*, Maâmar SOUIDI[2], Anne-Marie BATT[1], Claude LUTTON[3], Gérard SIEST[1] and Sophie VISVIKIS[1]

[1]INSERM U525, Université Henri Poincaré - Nancy 1, 30 Rue Lionnois, 54000 Nancy France
[2] Institut de Protection et de Sûreté Nucléaire SARAM/DPHD, rue Auguste Lemaire IPSN, BP 6, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex France
[3]Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Bâtiment 447, Université Paris XI, 91405 Orsay, France

***Corresponding author** :

Dr Luc Ferrari

INSERM U525 (Equipe 4)

Université Henri Poincaré, NANCY 1

30, rue Lionnois, 54 000 Nancy, FRANCE

Tel : 33 (0)3 83 68 21 79

Fax : 33 (0)3 83 32 13 22

E-mail : Luc.Ferrari@pharma.uhp-nancy.fr

Abbreviations used are : CsA, cyclosporine A; CTX, cerebrotendinous xanthomatosis, CYP, cytochrome P450, FCS, fetal calf serum; HMGR, HMG-CoA reductase; HPβCD, hydroxypropyl-β-cyclodextrin; RAPA, rapamycin.

Abstract

A side effect, common to immunosuppressive drugs, is an hyperlipidemia (increase in total cholesterol and triglycerides). One hypothesis is that these effects are related to an inhibition of the 27-hydroxylation of cholesterol (acid pathway of bile acid biosynthesis). This could be one of the causes of the increase in plasma cholesterol, because 27-hydroxycholesterol is a potent suppressor of HMG-CoA reductase. Sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) inhibition by cyclosporine being known, we tested the effect of the recently approved immunosuppressive drug rapamycin on this enzyme, and compared it with the inhibitory ability of cyclosporine in HepG2 mitochondria. This study confirmed the dose-dependent inhibition of mitochondrial CYP27A1 by cyclosporine (10-20 μM) while the inhibition by rapamycin required a higher dose (50-100 μM). Corresponding K_i was 10 μM for cyclosporine (non-competitive inhibition) and 110 μM for rapamycin (competitive inhibition). Cotreatment with both immunosuppressive drugs showed an additive inhibitory effect on sterol 27-hydroxylase activity. Afterwards, we analysed the effect of these immunosuppressants on HMG-CoA reductase expression in HepG2 cells. A dose-dependant upregulation of HMG-CoA reductase mRNA levels were observed with these both drugs. These results suggest that rapamycin and cyclosporine are both inhibitors of CYP27A1 activity with slightly different mechanisms and may accordingly increased HMGR expression.

Key words : Rapamycin, cyclosporine A, 27-hydroxycholesterol, immunosuppressive drugs, cholesterol.

Introduction

Rapamycin (sirolimus, RAPA) is a macrolide lactone (figure 1), originally developed as an antifungal and antitumor drug, but the focus of current interest has shifted towards its immunosuppressive activity that has been reported to be up to 100-fold greater than cyclosporine A (CsA, figure 1) (Kay *et al.* 1989). However, hyperlipidemia is a common adverse effect of treatment with RAPA or CsA (Brattström *et al.* 1998; Paul 1998). Over the first year, the treatment with RAPA significantly increased both the serum cholesterol and triglycerides (Kahan *et al.* 1998; McDonald *et al.* 2000). Of RAPA-treated patients, 20% displayed mean plasma cholesterol values that increased by more than 25 %, and 10 % had an increase of more than 50 % above baseline values after 2 weeks of treatment (Murgia *et al.* 1996). At therapeutic concentration, CsA had similar effects than RAPA on the above parameters (McDonald *et al.* 2000). In the present work, we focused on the mechanism of hypercholesterolemia caused by CsA or RAPA.

Complex mechanisms regulate the cholesterol metabolic pathways. Oxysterols intermediates metabolite of cholesterol, have a greater inhibitory effects, than cholesterol itself, on HMG-CoA reductase (HMGR), which is the rate-regulating enzyme of cholesterol synthesis (Javitt, 1994; Esterman 1983; Tamasawa *et al.* 1997). Axelson *et al* (1995) demonstrated that LDL-cholesterol was converted to 27-hydroxycholesterol and it reduced HMGR activity. On the basis of these observations, it has been hypothesized that circulating 27-hydroxycholesterol may be a potent negative feed-back regulator of HMGR in peripheral possibly liver cells (Axelson and Larsson 1995; Babiker *et al.* 1997). It has been proposed that the inhibition of the liver mitochondrial sterol 27-hydroxylase (also known as CYP27A1) activity induced by CsA (Princen *et al.*, 1991; Winegar *et al.* 1996; Souidi *et al.* 1999) may cause hypercholesterolemia. The consequence is a decrease of the negative feedback on HMGR

expression by 27-hydroxycholesterol, which could finally result in an increased cholesterol synthesis.

27-Hydroxycholesterol is the most abundant hydroxycholesterol in human (Oftebro *et al.* 1980) that is formed from cholesterol by the CYP27A1, a mitochondrial cytochrome P450 enzyme that is not only expressed in the liver but in many tissues (Andersson *et al.* 1989; Rennert *et al.* 1990; Björkhem *et al.* 1994). The sterol 27-hydroxylase catalyses the initial step in the alternative (or acidic) pathway of bile acid synthesis (Vlahcevic *et al.* 1997). In human hepatocytes, the alternative pathway contributes at least for 50 % of bile acid synthesis and leads predominantly to the formation of chenodeoxycholic acid (Princen *et al.* 1991; Vlahcevic *et al.* 1997). Furthermore, a genetic defect in the CYP27A1 gene leads to the development of cerebrotendinous xanthomatosis (CTX), an inborn error of bile acid metabolism characterized by large deposits of lipids and cholestanol and a premature atherosclerosis (Salen *et al.* 1987).

In order to assess if the proposed mechanism for CsA could be extended to RAPA, we compared in this study the effect of RAPA and CsA on CYP27A1 activity in the HepG2 human hepatoma cell line. A radioisotopic method was used to determine the activity of CYP27A1 in the presence or not of CsA or RAPA. Then we evaluated the effects of both immunosuppressors on the HMGR expression.

Materials and methods

Materials

Human hepatoblastoma HepG2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Cell culture medium RPMI 1640, L-Glutamine, antibiotics and cholesterol were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Fetal calf serum (FCS) were from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Plasticware used for cell culture were from Costar (Cambridge, MA). [4-^{14}C] cholesterol was purchased from NEN Life Sciences (Boston, MA). Sodium isocitrate, isocitrate deshydrogenase, NADPH and thin layer chromatography (TLC) plates on silica gel G were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). All solvents were from Merck Eurolab (Strasbourg, France).

Cell Culture

The HepG2 cells were grown to confluence in T-75 flasks at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Cell culture medium was supplemented with 10 % FCS, glutamine 4mM and antibiotic 1 % (penicillin, streptomycin, amphotericin). After development in flasks, cells were harvested by scraping in 3 ml of cold PBS and were pelleted at 1000g for mitochondrial preparation. For RNA preparation, HepG2 cells were seeded onto six-wells plates at a density of 6.10^5 cells/well. At confluence, cells were washed with RPMI without FCS during 24 hours to remove traces of FCS. Cells were then incubated in fresh DMEM with or without immunosuppressive drugs (cyclosporine A or rapamycin) in the presence or not of cholesterol water-soluble (Sigma) for up to 72 hours. Cells were recovered for RNA isolation.

RNA isolation

Isolation of total RNA was performed by guanidinium-thicyanate (GTC)/phenol mixture based on the technique described by Chomczynski and Sacchi (1987) according to the manufacturer's instructions with RNA Instapure (Eurogentec). Quantification of RNA was

obtained by absorbance at 260 nm. The integrity of the total RNA was checked by performing denaturating electrophoresis in 1% agarose gel.

Reverse transcription

Equal quantity (3μg) of RNA isolated from HepG2 cells were mixed, denatured for 5 min at 65°C then reverse transcribed in a final volume of 50μl containing 50mM TrisHCl, 75mM KCl, 3mM $MgCl_2$, 10mM dithiotreitol, 1mM each deoxynucleotides, 40 units RNAsine, 0.5μl BSA 100X, 5 ng oligodt and 200 units MMLV reverse transcriptase. The mixture was incubated 2 hours at 37°C and the enzyme was then inactivated by heating for 2 min at 95°C.

Semiquantitative PCR amplification

The cDNA mixture (2μl) was directly used for PCR (i-Cycler, Bio-Rad). The PCR mixture contained 10mM TrisHCl, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 200μM dNTP, 0.3μM (in the case of GAPDH), 0.5μM (in the case of HMGR) and 2.5 units of Taq DNA polymerase in a final volume of 50μl. The reaction profile for amplification consisted of an initial denaturation of 94°C for 5 min, followed by 32 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min, with a final elongation step at 72°C for 10 min. These PCR conditions were determined empirically in two series of experiments, which were conducted to confirm that all amplifications increased exponentially and that the plateau phase of the reaction had not been reached. The results are given as percent of the band intensity for mRNA in cholesterol treated HepG2 cells after normalization to the expression of housekeeping genes (GAPDH). The sequences of the primers used were from Shoda et al, 1995 (HMGR) and Andreou et al. 1998 (GAPDH).

Mitochondrial preparation

Cell pellets were homogenized in a Dounce homogenizer with 25 gentle strokes in homogenization buffer (0.1M Tris/ 1mM EDTA/ 0.1M KCl, pH 7,4). The homogenate was

centrifuged for 20 min at 20 000g. and the pellet was gently resuspended in the buffer and homogenized by 15 gentle stroke with a Dounce. The homogenate was centrifuged at 2000g for 10 min. The supernatant was then centrifuged at 9000g for 10 min and the mitochondrial pellet finally resuspended in Tris 10mM, EDTA 0,1mM and glycerol 23 %, sampled and stored at - 80°C until used. The protein concentration was measured according to Lowry *et al.* (1951).

Enzyme assays

Sterol 27-hydroxylase was assayed (according to Souidi *et al.* 1999) in the mitochondrial fraction by a radioisotopic method using 0.5 μCi [4-^{14}C] cholesterol (1.1 x 10^6dpm, 26 nmol, 52 μM) solubilized in 4.5 mg of hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) in a reaction mixture. Briefly, 250 μg of mitochondrial protein were pre-incubated during 30 min at 37°C with appropriate concentration of cyclosporine or rapamycin. The reaction was started by the addition of NADPH 1 mM to the incubation assay containing DL sodium isocitrate 5mM, isocitrate-dehydrogenase 0.2 U, mitochondrial fraction and [4-^{14}C] cholesterol solubilized in HPβCD for a total volume of 500 μl. The reaction was stopped after 6 min by adding 40 μl of 5N NaOH. After neutralisation with HCl, the sterols were extracted with 4.3 ml dichloromethane/ethanol (5/1, v/v) plus 1.2 ml H_2O. Unlabelled 27-hydroxycholesterol (75 μg) was added and separated from cholesterol by TLC on silica gel G using single migration technique with ethyl acetate/hexane (1/1, v/v).

Cyclosporine A (Coger, France) and rapamycin (generous gift from Wyeth-Ayerst, NY) were added in the assay mixture dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO), giving a final concentration of 0.1% (v/v) DMSO in the incubation medium. The same amounts of DMSO was added to the controls.

Data analyses

Data shown are the mean ± SE sterol 27-hydroxylase activity after treatment with CsA or RAPA (n=4 for each group). Due to the limited number of samples simultaneously analysed, we chose the Lineweaver plotting method for the kinetic analysis.

For HMGR mRNA analysis each experiment was performed in triplicates and repeated at least once in an independent setting. Data shown are the mean ± SE after treatment with cyclosporine A or rapamycin at various concentration Values were compared using the Student's t-test, and were considered different for a $p<0.05$.

Results

We first, examined the inhibition potential of RAPA compared with CsA on sterol 27-hydroxylase activity in the mitochondria of HepG2 cells by an elevated dose of each immunosuppressor : 120 μM (data not shown). At this concentration, the activity of CYP27A1 was completely inhibited by CsA (undetectable activity) while RAPA caused an inhibition of less than 70 %. No effect was observed with 0.1μM of RAPA but the inhibitory effect required at least 50 μM (figure 2B and 3B). CsA dose-dependently (5-20 μM) inhibit CYP27A1 activity (figure 2A). The addition of both immunosuppressive drugs on HepG2 mitochondria increased the inhibitory effect on sterol 27-hydroxylase activity (figure 2C). This additional effect was obvious only for elevated concentration of RAPA (100 μM) (figure 2B).

Afterwards, relative affinities of sterol 27-hydroxylase for its substrate (cholesterol) or its inhibitors (CsA or RAPA) were determined to study the mechanism of mitochondrial CYP27A1 inhibition in human HepG2 cells. Lineweaver-Burk's curves allowed us to calculate, for CYP27A1 activity, an apparent K_m of 85 μM of cholesterol and a V_{max} of 0.91 nmol/min/mg of protein without immunosuppressive drugs (Control, figure 3). In the presence of CsA, we obtained a K_i of 10 μM of CsA. The Km was similar to the control indicating that the mechanism of inhibition would be of a non-competitive type (figure 3A). RAPA was responsible for a competitive inhibition (V_{max} = 0.89 nmol/min/mg) and required a higher concentration for inhibiting the sterol 27-hydroxylase activity (K_i = 110 μM) (figure 3B).

Finally, HMGR expression were estimated by semi-quantitative PCR to verify the hypothesis of the unrepressed HMGR expression in the presence of CsA or RAPA. Firstly, we assayed cholesterol effect on HMGR expression because of the high expression of HMGR in serum free condition. Without cholesterol, no modification of HMGR expression by

immunosuppressive drugs were observed in HepG2 cells (data not shown). In cholesterol treated cells, a significant decreased was observed starting with 50μM (figure 4A) probably because of the feedback downregulation of cholesterol or oxysterols on HMGR expression. In this range of concentration (50-200 μM) no dose effect were observed, 50μM were probably sufficient to decreased mRNA HMGR levels at a maximum rate. In the CsA and RAPA treated HepG2 cells the mRNA for the rate limiting enzyme HMGR, was increased in a dose-dependant manner (figure 4B, 4C). Adding 1μM of CsA to the culture medium led to a non significant increase of HMGR mRNA, only 10μM significantly decrease HMGR expression compared to control treated cells with cholesterol (100μM) (figure 4B). Lesser levels of RAPA than CsA were needed to increased HMGR expression : 0.01μM had no effect whereas 0.1μM and 1μM of RAPA increased significantly HMGR respectively by 33 and 75% (figure 4C).

In the same conditions, we assayed CYP27A1 mRNA levels, which were not affected by cholesterol and by addition of CsA or RAPA in the culture medium (data not shown). These immunosuppressive drugs would specifically affect CYP27A1 activity.

Discussion

Cholesterol homeostasis is the result of an equilibrium between dietary cholesterol absorption, cellular *de novo* synthesis and hepatic catabolism of bile acids. A dysregulation of these input and output pathways produces metabolic disorders leading to a risk of development of atherosclerosis. In primary cultures of rat and human hepatocytes, the addition of CsA (10μM) decreased the conversion of cholesterol into bile acids by approximately 50 %, suggesting that the acid pathway accounts for 50 % of the total bile acid biosynthesis (Princen *et al.* 1991). The aim of this study was to compare the *in vitro* effects of CsA and RAPA on the CYP27A1 activity. While both immunosuppressive drugs were found to inhibit this activity, RAPA appeared to be a weaker inhibitor of CYP27A1 activity than CsA. We studied this inhibition in HepG2 cells as a model system for human liver cells. It was reported to be an appropriate model to study the regulation of bile acids biosynthetic enzymes (Pandak *et al.* 1996) especially because of the high mitochondrial sterol 27-hydroxylase enzyme content in HepG2 and because chenodeoxycholic acid is the primary acid mainly secreted by these cells (Pandak *et al.* 2001).

Our study showed that CsA was a non-competitive inhibitor of CYP27A1 activity (figure 3). Dahlback-Sjoberg *et al* (1993) proposed the same type of inhibition while for Winegar et al (1996) it seems competitive. CsA appears to affect the interaction between cholesterol and CYP27A1. The hypothesis was made that CsA and cholesterol appeared to bind to different sites on the enzyme. Experiments with radiolabeled CsA also indicated binding of CsA to the purified enzyme (Dahlback-Sjoberg *et al.* 1993). Furthermore, for Segev et al (2001), CsA affects bile acid metabolism by repressing CYP27A1 at the transcriptional level. To date, no data about the influence of RAPA on important parameters of bile acid formation and composition are available. In this study, we showed for the first time that RAPA caused a competitive inhibition of CYP27A1 activity (figure 3). Moreover, a

recent study demonstrated that both RAPA and CsA reduced bile flow, and that CsA also reduced biliary cholesterol and glutathion excretion (Deters *et al.* 2001). Bile acid synthesis in rat and human hepatocytes was inhibited markedly by CsA at concentration (5-10μM) which approximate the plasma levels of the drug commonly observed in patients (0.5-5 μM) (Frey *et al.* 1988). We used the same range of concentration for our experiments. RAPA dose used for *in vitro* inhibition of sterol 27-hydroxylase in this study (50-100 μM) had to be higher than the plasma concentration observed (0.01-0.02 μM) after treatment with 2 or 5 mg/day (McDonald *et al.* 2000). Even if maximum blood concentrations usually don't exceed 0.1μM, it has been shown that in the rat, depending on the RAPA dose, liver tissue concentration is up to 20 fold higher than blood concentration (Napoli *et al.* 1997). The cotreatment with these both drugs caused, in this study, a cumulative inhibitory effect on sterol 27-hydroxylase activity (figure 2). Moreover, RAPA seemed to enhance the hyperlipidemic effects of CsA in therapeutic (Kahan *et al.* 1998) which could be partly explained by the inhibition of CYP27A1 activity.

The inhibition of sterol 27-hydroxylase by both CsA and RAPA could be explained by a roughly monocyclic chemical structure (cyclopeptide and macrolide respectively) of these immunosuppressants (figure 1). These 2 compounds have a lipophilic pole : carboxylic chain for CsA and conjugated double bound for RAPA. The (non-competitive) inhibition due to CsA would result from the interaction with the active site of the enzyme of one isopropyl chain, among the four branched out of the macrocyclic ring of the CsA molecule. Indeed, the sterol 27-hydroxylase activity is also inhibited by various oxysterols like 7β-hydroxycholesterol, cholestanol or epicoprostanol, all bearing such a chain (Souidi *et al.* 1999). The (competitive) inhibition caused by RAPA might involve the conformational position of O-methyl substituant on the cyclohexyl-ring, the major metabolic group of the molecule (encircle, Figure 1), which undergoes a 39-O-demethylation by CYP3A (Lampen *et*

al. 1998; Kuhn *et al.* 2001). In addition, regions of the amino acid sequence containing the heme binding core region are highly conserved in all cytochrome P450s (Graham *et al.* 1999). Kuhn et al (2001) suggested that hydrogen donor functionalities close to the metabolic site and in appropriate relative position to it, are important for anchoring the substrate at the catalytic heme center. So, the cyclohexyl-ring of RAPA might stock in the catalytic heme center of sterol 27-hydroxylase and cause a competitive inhibition against cholesterol. This difference in intimate structure of the molecules could account for the different types of inhibition observed in this work.

According to our data, an explanation of the hyperlipidemic effects of CsA or RAPA could be an indirect upregulation of HMGR (figure 4). Bile acids, which are the final product of degradation of cholesterol, are effective inhibitors of HMGR in vivo (Björkhem *et al.* 1997). Several oxygenated cholesterol derivatives (oxysterols), particularly 27-hydroxycholesterol, are also potent suppressors of HMGR and may serve to inhibit cellular cholesterol synthesis (Axelson and Larsson, 1995; Javitt, 1994). Circulating 27-hydroxycholesterol may be a potent negative feedback regulator of HMGR activity both in liver and in peripheral cells (Martin et al, 1997). We hypothesized that increased HMG-CoA reductase expression observed in hepatoma cells (figure 4), human fibroblast cells (Axelson and Larsson, 1995) or a mouse model (Wu et al, 1999) was a consequence of CYP27A1 inhibition. Subjects with deficiency in CYP27A1 show an accumulation of cholesterol and its metabolite, cholestanol, in multiple tissues. Moreover, an overexpression of CYP27A1 was coupled with a decreased cholesterol biosynthesis (50% HMG-CoA reductase activity) in CHO cells (Hall *et al.* 2001). 27-Hydroxycholesterol is the major oxysterol present in atherosclerotic plaques (Crisby *et al.* 1997) as the formation of 27-hydroxycholesterol by sterol 27-hydroxylase normally prevents the accumulation of cholesterol excess in tissues (Russell, 2000). In addition, when alveolar macrophages expressing CYP27A1 were exposed

to an inhibition by CsA, there was an accumulation of cholesterol in these cells (Diczfalusy *et al.* 1996). These reports suggest that the sterol 27-hydroxylase can act as an anti-atherosclerotic enzyme in the wall of vessels by favouring the elimination of cholesterol.

In conclusion, we report that RAPA (sirolimus) is a competitive inhibitor of sterol 27-hydroxylase activity. This immunosuppressive drug is a less powerfull inhibitor (K_i = 111.2 μM) of the sterol 27-hydroxylase activity than cyclosporine (K_i = 10.5 μM). Furthermore, these immunosuppressive drugs act by different mechanisms as competitive or non-competitive inhibitors for RAPA or CsA, respectively. These inhibitions are concomitant to an increase of the HMGR expression. These results would partly explained the hypercholesterolemia caused by RAPA. One's can supposed that some chemical structure modifications of these immunosuppressive drug would diminished this side effect.

References

Andersson, S., Davis, D.L., Dahlback, H., Jornvall, H. and Russell, D.W., 1989, Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *Journal of Biological Chemistry,* **264,** 8222-8229.

Axelson, M. and Larsson, O., 1995, Low density lipoprotein (LDL) cholesterol is converted to 27-hydroxycholesterol in human fibroblasts. Evidence that 27-hydroxycholesterol can be an important intracellular mediator between LDL and the suppression of cholesterol production. *Journal of Biological Chemistry,* **270,** 15102-15110.

Babiker A, Andersson O, Lund E, Xiu RJ, Deeb S, Reshef A, Leitersdorf E, Diczfalusy U, Bjorkhem I. 1997 Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. J Biol Chem.;272(42):26253-61.

Bjorkhem, I., Andersson, O., Diczfalusy, U., Sevastik, B., Xiu, R.J., Duan, C. and Lund, E., 1994, Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,* **91,** 8592-8596.

Bjorkhem, I., Lund, E. and Rudling, M., 1997, Coordinate regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and HMG-CoA reductase in the liver. *Subcellular Biochemistry,* **28,** 23-55.

Brattström, C., Wilczek, H.E., Tyden, G., Bottiger, Y., Sawe, J. and Groth, C.G., 1998, Hypertriglyceridemia in renal transplant recipients treated with sirolimus. *Transplantation Proceedings,* **30,** 3950-3951.

Chomczynski P. Sacchi N. 1987 single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem ;162(1):156-9

Crisby, M., Nilsson, J., Kostulas, V., Bjorkhem, I. and Diczfalusy, U., 1997, Localization of sterol 27-hydroxylase immuno-reactivity in human atherosclerotic plaques. *Biochimica et Biophysica Acta,* **1344,** 278-285.

Dahlback-Sjoberg, H., Bjorkhem, I. and Princen, H.M., 1993, Selective inhibition of mitochondrial 27-hydroxylation of bile acid intermediates and 25-hydroxylation of vitamin D3 by cyclosporine A. *Biochemical Journal,* **293,** 203-206.

Deters, M., Nolte, K., Kirchner, G., Resch, K. and Kaever, V., 2001, Comparative study analyzing effects of sirolimus-cyclosporine and sirolimus-tacrolimus combinations on bile flow in the rat. *Digestive Disease and Science,* **40,** 2120-6.

Diczfalusy, U., Lund, E., Lutjohann, D. and Bjorkhem, I., 1996, Novel pathways for elimination of cholesterol by extrahepatic formation of side-chain oxidized oxysterols. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, **226,** 9-17.

Esterman AL, Baum H, Javitt NB, 1983 Darlington GJ26-hydroxycholesterol: regulation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase activity in Chinese hamster ovary cell culture. J Lipid Res;24(10):1304-9

Frey, F.J., Horber, F.F. and Frey, B.M., 1988, Trough levels and concentration time curves of cyclosporine in patients undergoing renal transplantation. *Clininical Pharmacology & Therapeutics,* **43,** 55-62.

Graham, S.E. and Peterson, J.A., 1999, How similar are P450s and what can their differences teach us? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **369,** 24-29.

Hall, E., Hylemon, P., Vlahcevic, Z., Mallonee, D., Valerie, K., Avadhani, N. and Pandak, W., 2001, Overexpression of CYP27 in hepatic and extrahepatic cells: role in the regulation of cholesterol homeostasis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,* **281,** G293-301.

Javitt, N.B., 1994, Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways. *FASEB Journal,* **8,** 1308-1311.

Kahan, B.D., Podbielski, J., Napoli, K.L., Katz, S.M., Meier-Kriesche, H.U., Van Buren, C.T., 1998, Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. *Transplantation,* **66,** 1040-1046.

Kay, J.E., Benzie, C.R., Goodier, M.R., Wick, C.J. and Doe, S.E., 1989, Inhibition of T-lymphocyte activation by the immunosuppressive drug FK-506. *Immunology,* **67,** 473-477

Kuhn, B., Jacobsen, W., Christians, U., Benet, L.Z. and Kollman, P.A., 2001, Metabolism of sirolimus and its derivative everolimus by cytochrome P450 3A4: insights from docking, molecular dynamics, and quantum chemical calculations. *Journal of Medicinal Chemistry,* **44,** 2027-2034.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry,* **193,** 265-275.

MacDonald, A., Scarola, J., Burke, J.T. and Zimmerman, J.J., 2000, Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. *Clinical Therapeutics,* **22,** B101-121.

Martin K.O., Reiss A.B., Lathe R., Javitt N.B. 1997 7 alpha-hydroxylation of 27-hydroxycholesterol: biologic role in the regulation of cholesterol synthesis. J Lipid Res;38(5):1053-8

Murgia, M.G., Jordan, S. and Kahan, BD., 1996, The side effect profile of sirolimus: a phase I study in quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant patients. *Kidney International,* **49,** 209-216.

Napoli, K.L., Wang, M.E., Stepkowski, S.M., Kahan, B.D., 1997, Distribution of sirolimus in rat tissue. *Clinical Biochemistry,* **30,** 135-42.

Oftebro, H., Bjorkhem, I., Skrede, S., Schreiner, A. and Pederson, J.I., 1980, Cerebrotendinous xanthomatosis: a defect in mitochondrial 26-hydroxylation required for normal biosynthesis of cholic acid. *Journal of Clinical Investigation,* **65,** 1418-1430.

Pandak, W.M., Schwarz, C., Hylemon, P.B., Mallonee, D., Valerie, K., Heuman, D.M., Fisher, R.A., Redford, K. and Vlahcevic, Z.R., 2001, Effects of CYP7A1 overexpression on cholesterol and bile acid homeostasis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,* **281,** G878-889.

Pandak, W.M., Stravitz, R.T., Lucas, V., Heuman, D.M. and Chiang, J.Y., 1996, HepG2 cells: a model for studies on regulation of human cholesterol 7alpha-hydroxylase at the molecular level. *American Journal of Physiology,* **270,** G401-10.

Paul, L.C., 1998, Adverse effects of immunosuppressive drugs on long-term graft outcome. *Transplantation Proceedings,* **30,** 4001-4004.

Princen, H.M.G., Meijer, P., Wolthers, B.G., Vonk, R.J. and Kuipers, F., 1991, Cyclosporine A blocks bile acid synthesis in cultured hepatocytes by specific inhibition of chenodeoxycholic acid synthesis. *Biochemical Journal,* **275,** 501-505.

Rennert, H., Fischer, R.T., Alvarez, J.G., Trzaskos, J.M. and Strauss, J.F., 1990, Generation of regulatory oxysterols: 26-hydroxylation of cholesterol by ovarian mitochondria. *Endocrinology,* **127,** 738-746.

Russell, D.W., 2000, Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta,* **1529,** 126-135.

Salen, G., Berginer, V., Shore, V., Horak, I., Horak, E., Tint, G.S. and Shefer, S., 1987, Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. Effect of chenodeoxycholic acid. *New England Journal of Medicine,* **316,** 1233-1238.

Segev, H., Honigman, A., Rosen, H. and Leitersdorf, E., 2001, Transcriptional regulation of the human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) and promoter mapping. *Atherosclerosis*, **156,** 339-347.

Souidi, M., Parquet, M., Ferezou, J. and Lutton, C., 1999, Modulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. *Life Science,* **64,** 1585-1593.

Tamasawa N, Hayakari M, Murakami H, Matsui J, Suda T. 1997 Reduction of oxysterol levels up-regulates HMG-CoA reductase activity in rat liver. Atherosclerosis.;131(2):237-42.

Vlahcevic, ZR, Stravitz, RT, Heuman, DM, Hylemon, PB and Pandak, WM, 1997, Quantitative estimations of the contribution of different bile acid pathways to total bile acid synthesis in the rat. Gastroenterology, 113, 1949-1957.

Wu J, Zhu YH, Patel SB. 1999 Cyclosporin-induced dyslipoproteinemia is associated with selective activation of SREBP-2. Am J Physiol 277(6 Pt 1) E1087-94

Winegar, DA, Salisbury, JA, Sundseth, SS and Hawke, RL. 1996 Effects of cyclosporine on cholesterol 27-hydroxylation and LDL receptor activity in HepG2 cells. Journal of Lipid Research. 37 179-191.

Acknowledgements

Y. Gueguen was supported by the Région Lorraine. The authors will thank Michel Parquet (Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Paris XI, Orsay) for valuable advices in the preparation of the manuscript and Vincent Loppinet for critical reading of the manuscript. The authors will thank Wyeth-Ayerst for the generous gift of rapamycin and for financial support.

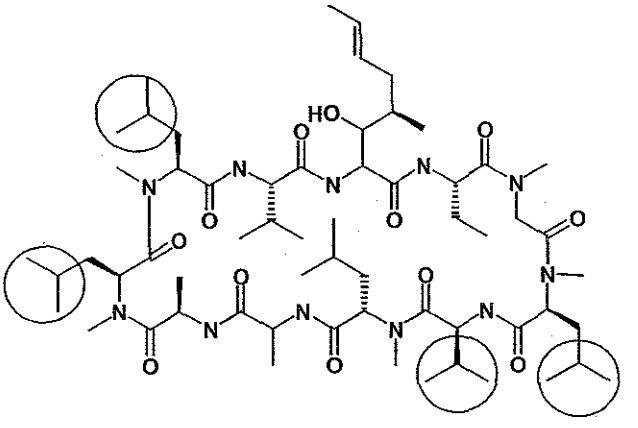
Legends for figures

Figure 1 : Chemical structure of Cyclosporine A and Rapamycin (Sirolimus). The four isopropyl chain out of the monocyclic ring of the CsA molecule and 39-O-Me metabolic group of RAPA were marked by circles.

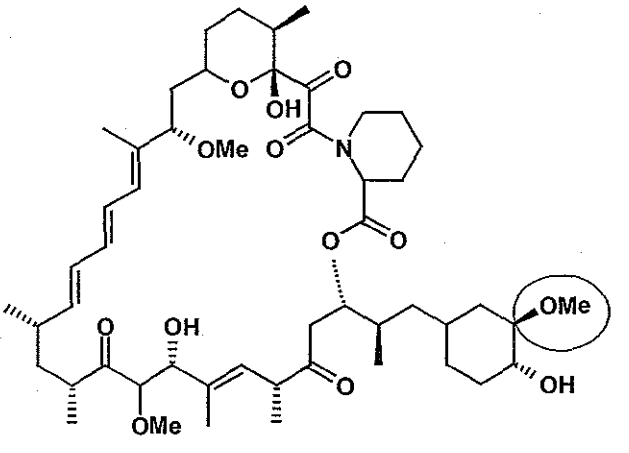
Figure 2 : Comparison effects of treatment with **(A)** cyclosporine (5 and 20μM) and **(B)** rapamycin (0.1 and 100μM) alone or **(C)** together (cotreatment), on sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) activity in HepG2 mitochondria. Immunosuppressive drugs were added with DMSO giving a final concentration of 0.1%. The same amount of DMSO was added to the control. Data shown are the mean ± SE (n = 4 for each group) CYP27A1 activity after treatment with CsA or RAPA. *** $p < 0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$, significantly different from the control group by the Student t test.

Figure 3 : Inhibition of the sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) activity in HepG2 mitochondria by 10 and 20 μM of cyclosporine **(A)** or 50 and 100μM of rapamycin **(B)**. The sterol 27-hydroxylase activity was measured in mitochondria isolated from HepG2 confluent cells as described in the Material and Methods. The final concentration of cholesterol varies from 10 to 160 μM. These graphics show Lineweaver-Burk's curves allowing the determination of the enzyme kinetics in the absence (control) or presence of cyclosporine or rapamycin. The icon small graphs represent Hofstee plots extrapolated from Lineweaver-Burk plots. Data shown are the mean ± SE sterol 27-hydroxylase activity (n = 4 for each group).

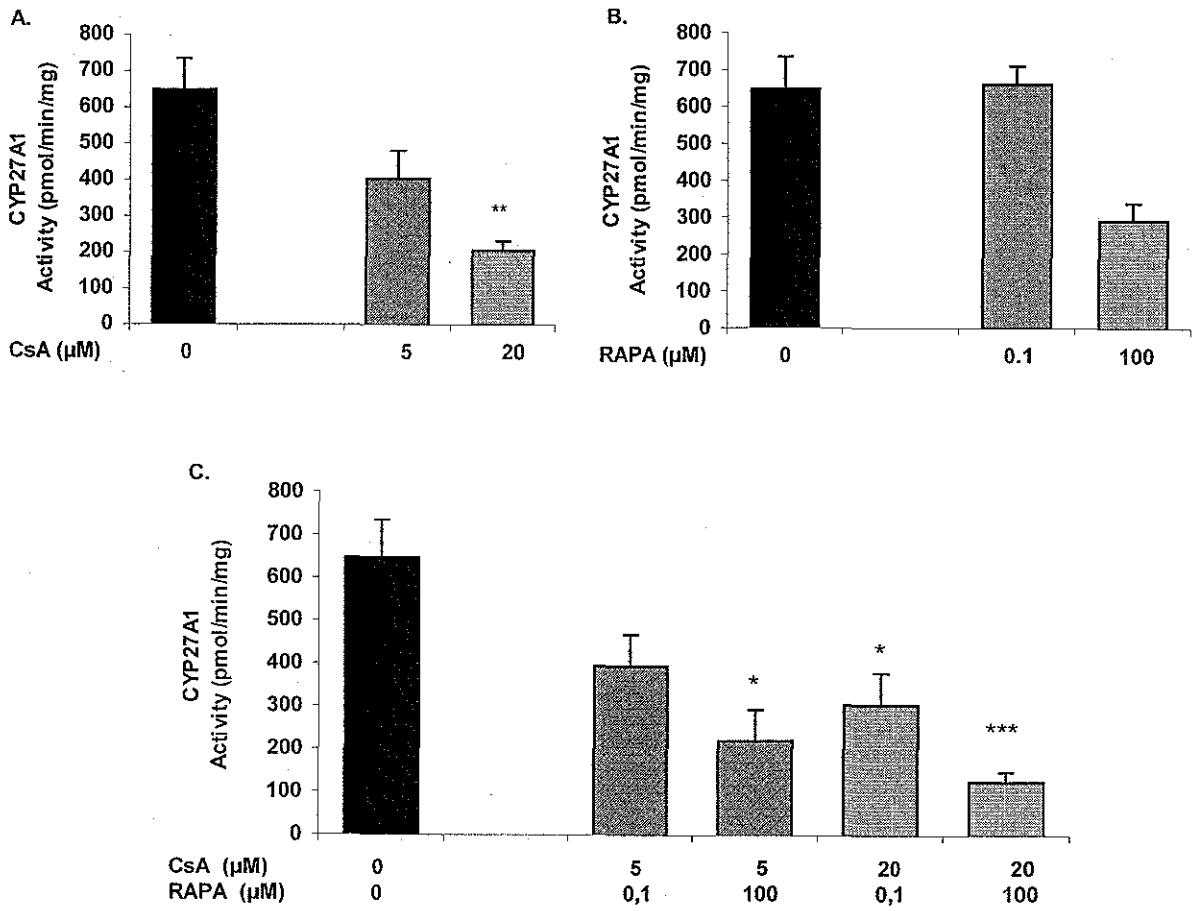
Figure 4 : Effect of **(A)** cholesterol alone (50 to 200 μM) and dose dependant effect of **(B)** cyclosporine (0.1 to 10 μM) and **(C)** rapamycin (0.01 to 1 μM) on HMG-CoA reductase mRNA levels in HepG2 cells in the presence of cholesterol (100μM) after 72h. Data shown are the mean ± SE of three different experiments (n = 3 for each group) HMGR mRNA levels after treatment with CsA or RAPA. HMGR mRNA relative expression were assessed by RT-PCR as described in materials and methods. ** $p<0.01$, * $p<0.05$, significantly different from the cholesterol group by the Student t test.

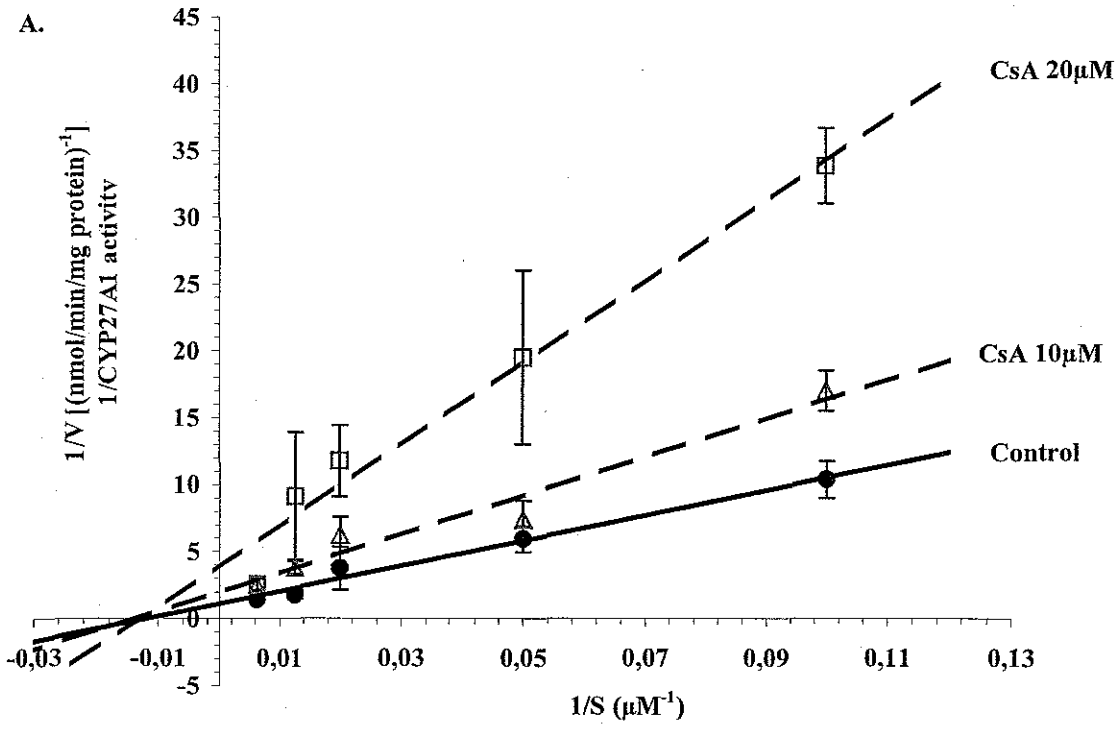


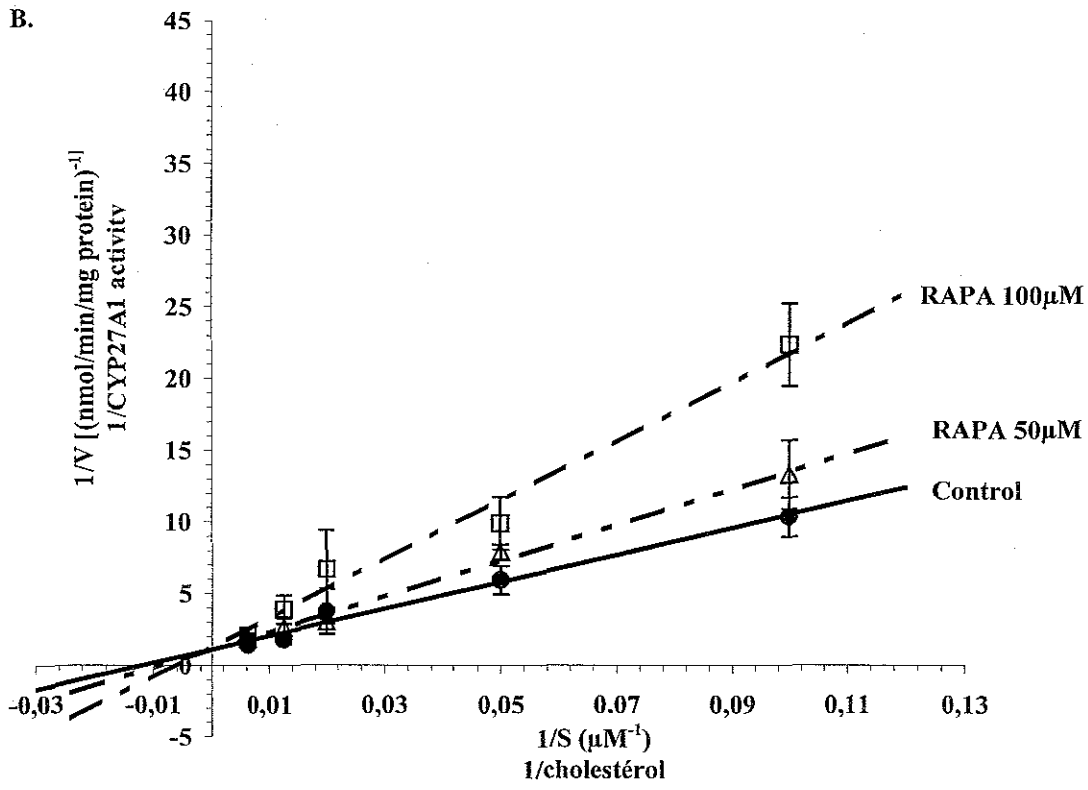
Cyclosporine A

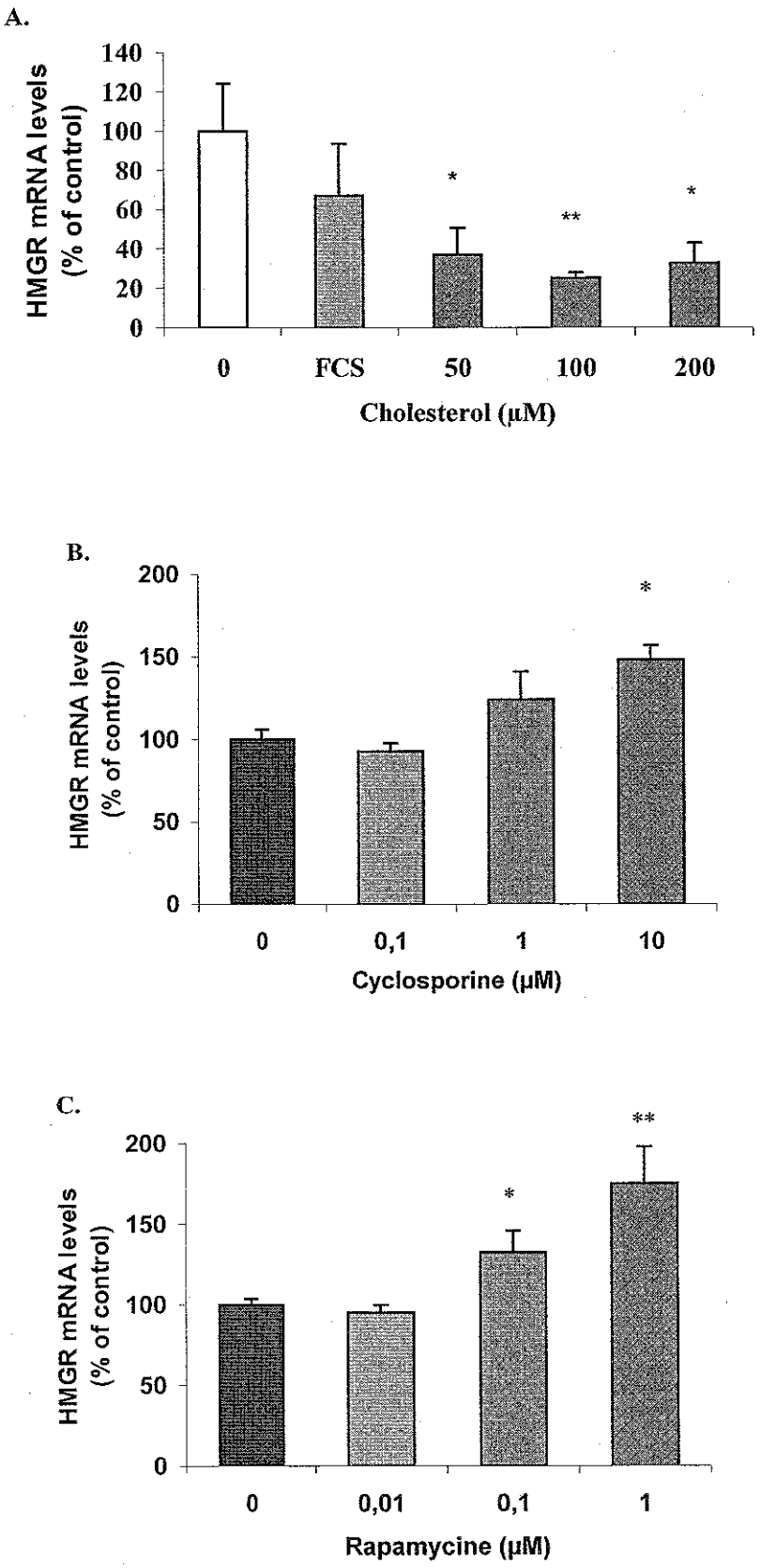


Rapamycine


A.
CYP27A1
Activity (pmol/min/mg)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
**
CsA (µM)
0
5
20
B.
CYP27A1
Activity (pmol/min/mg)
RAPA (µM)
0
0.1
100
C.
CYP27A1
Activity (pmol/min/mg)
*
*
***
CsA (µM)
RAPA (µM)
0
0
5
0,1
5
100
20
0,1
20
100


A.
1/V [(nmol/min/mg protein)-1]
1/CYP27A1 activity
CsA 20µM
CsA 10µM
Control
1/S (µM-1)


B.
1/V [(nmol/min/mg protein)-1]
1/CYP27A1 activity
RAPA 100µM
RAPA 50µM
Control
1/S (µM-1)
1/cholestérol


A.
HMGR mRNA levels
(% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
*
**
*
0
FCS
50
100
200
Cholesterol (µM)
B.
HMGR mRNA levels
(% of control)
200
150
100
50
0
*
0
0,1
1
10
Cyclosporine (µM)
C.
HMGR mRNA levels
(% of control)
200
150
100
50
0
*
**
0
0,01
0,1
1
Rapamycine (µM)

II. Effets de la rapamycine et de la ciclosporine A sur les activités enzymatiques CYP7A1, CYP7B1 et HMG-CoA réductase dans les microsomes de cellules HepG2.

II.1. Effets de la CsA et de la RAPA sur les CYP7A1 et CYP7B1

Le CYP7A1 responsable de l'initiation de la voie classique (neutre) du métabolisme des acides biliaires était considéré longtemps comme la seule enzyme responsable de l'hydroxylation du cholestérol par une seule voie de biosynthèse des acides biliaires. La découverte de l'activité CYP27A1 a permis d'identifier une seconde voie dont l'importance est devenue grandissante (Vlahcevic et coll, 1997). Ces 2 voies partagent certains métabolites et peuvent conduire aussi bien l'une que l'autre à la production d'acide cholique ou d'acide chénodéoxycholique même s'il est acquis que la voie neutre aboutit préférentiellement à la formation d'acide cholique et la voie acide à la formation d'acide chénodéoxycholique.

Contrairement à son effet sur le CYP27A1, l'effet de la CsA sur le CYP7A1 a été très peu étudié et les rares travaux publiés observent une activité très faible dans les cellules HepG2 (Javitt, 1994 ; Hassan et coll, 1992 ; Erickson et Fielding, 1986). En effet ce modèle cellulaire produit essentiellement de l'acide chénodéoxycholique du fait de la prépondérance de la voie acide (Everson et Polokoff 1986). L'activité que nous avons dosée est également à la limite de sensibilité de la technique de dosage (4-5 pmol/min/mg de protéines), les éventuels effets de la CsA ou de la RAPA n'ont donc pas pu être observés. De plus, une étude récente effectuée chez des personnes ayant un phénotype hypercholestérolémique, décrit une déficience en CYP7A1 associée à une augmentation de LDL et de l'activité CYP27A1 (Pullinger et coll, 2002). Néanmoins, l'activité CYP7A1 dosée à partir de microsomes hépatiques de Hamster ne semble pas affectée par la CsA (Souidi et coll, 1999). La faible activité mesurée ne nous permet pas de conclure quant à un éventuel effet de la CsA ou de la RAPA sur cette enzyme chez l'homme.

L'importance du CYP7B1 dans le métabolisme des acides biliaires et l'homéostasie du cholestérol ont été longtemps sous-estimées (Schwartz et coll, 1998). L'oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1) a une large spécificité de substrats, il est donc susceptible de

métaboliser des oxystérols potentiellement cytotoxiques en composés hydroxylés qui sont plus solubles donc plus facilement excrétés. Le gène CYP7B1 code pour l'enzyme majeure du catabolisme du 27-hydroxycholestérol produit par le CYP27A1 (Wu et coll, 1999a). Il existe un seul cas de mutation non sens rapporté par la littérature : le patient (homozygote muté) ayant une concentration plasmatique de 27-hydroxycholestérol 1000 fois supérieure à la normale (Setchell et coll, 1998). Les souris knock-out CYP7B1 présentent une accumulation dans le plasma et différents tissus de 25 et 27-hydroxycholestérols (Li-Hawkins et coll, 2000) ce qui montre le rôle principal de cette enzyme qui est de métaboliser ces oxystérols. Dans certaines conditions, quand le CYP7A1 est inhibé, le CYP7B1 est capable de suppléer l'activité CYP7A1. Néanmoins, chez des souris déficientes en LXRα et n'ayant aucune induction de l'activité cyp7a1, aucune modification de transcription de cyp7b1 n'est observée (Peet et coll, 1998b). Les processus régulant l'activité et l'expression du CYP7B1 ont été peu étudiés ; néanmoins le cholestérol et certains oxystérols ont une action inhibitrice sur son activité (Martin et coll, 1993 ; Souidi et coll, 2000).

Différentes études ont montré le pouvoir inhibiteur du 27-hydroxycholestérol sur la biosynthèse du cholestérol (Taylor et coll, 1984 ; Martin et coll, 1997). Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment, une inhibition enzymatique de l'activité CYP27A1 produisant le 27-hydroxycholestérol à partir du cholestérol pourrait engendrer localement une augmentation de la biosynthèse du cholestérol.

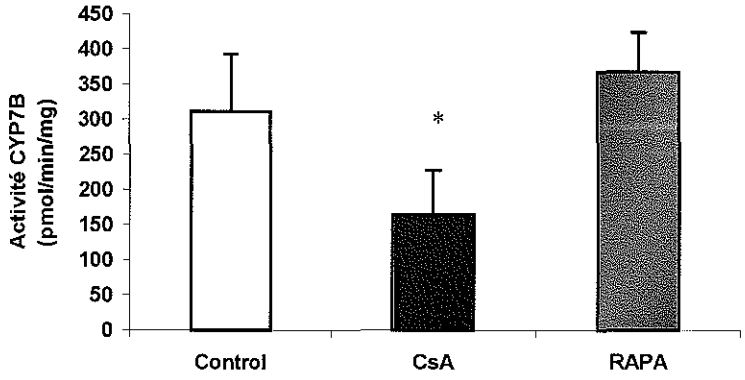


Figure 14 *: Effets de la Ciclosporine A et de la Rapamycine (20μM) sur l'activité oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1) dans les microsomes de cellules HepG2*
**p<0.05, significativement différent du groupe témoin par le test de Student*

Le CYP7B1 ayant pour substrat essentiel le 27-hydroxycholestérol dans le foie, nous avons étudié l'effet de la CsA et de la RAPA sur l'activité enzymatique de cette enzyme dans des microsomes de cellules HepG2 **(Figure 14)**. Seule la CsA inhibe significativement l'activité CYP7B1 conformément aux résultats observés par ailleurs chez le Hamster (Souidi et coll, 2000). Pour une même concentration, la RAPA ne modifie pas l'activité CYP7B1. Des analyses approfondies seraient nécessaires pour écarter un éventuel effet à des doses supérieures. Néanmoins, les concentrations d'immunosuppresseurs utilisées sont supérieures (CsA) ou similaires (RAPA) à celles utilisées pour l'inhibition de l'activité CYP27A1 (***Publication 1***). Au vu de ces résultats, nous pouvons supposer que la diminution d'activité de CYP7B1 ainsi que celle de CYP27A1 en présence des immunosuppresseurs reflèterait une diminution de la synthèse des acides bilaires par la voie acide. Par conséquent, la diminution de certains acides biliaires hydrophobes (ACDC) favoriserait une diminution du rétrocontrôle de la synthèse de cholestérol.

II.2. Effets de la CsA et de la RAPA sur l'activité HMG-CoA réductase

L'HMGR est l'enzyme clé de la biosynthèse du cholestérol. Elle est régulée par un mécanisme de rétrocontrôle multivalent impliquant le cholestérol lui-même, certains oxystérols et acides biliaires. Cette répression s'effectue essentiellement via une régulation de l'expression de son gène ou sur la demi-vie de l'enzyme.

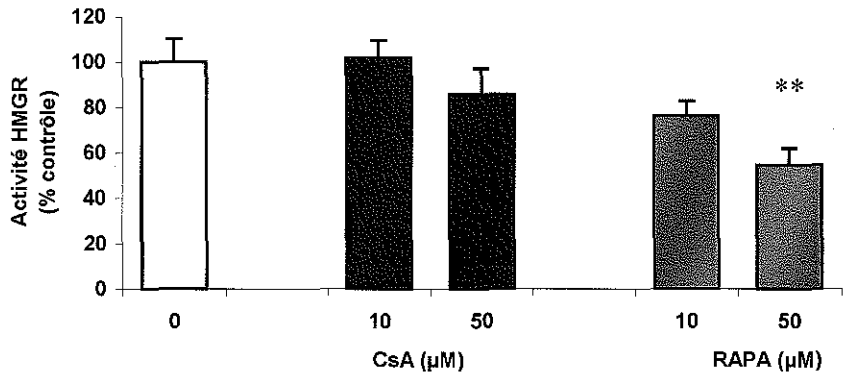


Figure 15 *: Effets de la CsA et de la RAPA sur l'activité HMGR dans les microsomes de cellules HepG2*
***p<0.01, significativement différent du groupe témoin par le test de Student*

Après avoir étudié l'effet de la CsA et de la RAPA sur l'expression de l'HMGR, nous avons voulu vérifier que ces immunosuppresseurs n'affectaient pas directement l'activité de cette enzyme. Nous avons étudié l'effet de la CsA et de la RAPA directement sur l'activité HMGR. Les microsomes de cellules HepG2 contenant cette enzyme sont incubés en présence de différentes doses d'immunosuppresseurs. De manière surprenante, une diminution significative de l'activité HMGR est observée en présence de RAPA à une forte dose (50µM) alors que la CsA n'affecte pas significativement son activité **(Figure 15)**.

L'expression de l'HMGR est induite après traitement par la CsA ou la RAPA. L'effet des immunosuppresseurs sur l'activité HMGR est négligeable par rapport à l'effet observé sur l'expression de ce gène (***Figure 13***) : 1µM de RAPA est responsable d'une stimulation de l'expression de plus de 75% alors qu'une concentration 50 fois plus importante est nécessaire pour inhiber l'activité HMGR d'environ 40%. Après administration des doses thérapeutiques de CsA (150-400 ng/ml) ou de RAPA (5-20 ng/ml), les concentrations plasmatiques sont respectivement de l'ordre de 0.5-5µM pour la CsA et de 0,01-0,1µM pour la RAPA, les concentrations utilisées pour l'étude de la régulation de l'expression de différents gènes sont proches, 0.1 à 10µM pour la CsA et 0.01 à 1µM pour la RAPA. Il est à noter que, au niveau de certains tissus, notemment le foie, les concentrations d'immunosuppresseurs dosés peuvent être beaucoup plus importantes que dans le plasma (Napoli et coll, 1997). Toutefois, les doses utilisées pour inhiber l'activité HMGR ainsi que le CYP27A1 sont nécessairement plus élevées (10-100µM). On peut donc supposer que l'effet inducteur de l'expression prime sur l'éventuelle inhibition de l'activité HMGR qui n'apparaîtrait qu'à des fortes doses.

III. Effets de la rapamycine et de la ciclosporine sur l'expression de gènes impliqués dans le transport du cholestérol et la secrétion d'apolipoprotéines majeures par les cellules HepG2 (Publication 2)

Dans cette partie du travail, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur le transport du cholestérol. Pour ce faire, nous avons tout d'abord analysé l'effet de la CsA et de la RAPA sur l'expression des récepteurs des LDL (LDL-R) et des HDL (SRBI) par les cellules HepG2. En parallèle, la sécrétion de différentes apolipoprotéines majeures a été dosée dans les surnageants cellulaires.

Les récepteurs de lipoprotéines jouent un rôle central dans le métabolisme lipidique et ainsi dans l'homéostasie du cholestérol. Le LDL-R majoritairement exprimé dans le foie permet la capture des particules LDL, riches en cholestérol, et leur élimination via la transformation en acides biliaires. D'autre part, l'expression de SRBI, plus récemment identifié comme le récepteur des HDL est également analysée. Dernièrement l'identification de la protéine de transport ABCA1 impliquée dans l'efflux du cholestérol cellulaire a conduit à la publication de nombreux travaux démontrant son rôle essentiel dans le métabolisme des lipoprotéines et la biogenèse des HDL (Langman et coll, 1999 ; Wang et coll, 2001).

L'expression du LDL-R est fortement diminuée en présence de ces immunosuppresseurs : nous montrons une répression dose-dépendante par la RAPA (0.01 à 1μM) ou la CsA (0.1 à 10 μM) alors que l'addition de cholestérol semble augmenter son expression (***Figure 16***). Pourtant, différents travaux mettent en évidence une corrélation positive de la régulation de l'HMGR et du LDL-R (Goldstein et Brown, 1984; Rudling et coll, 1992). Cette régulation commune fait intervenir le facteur de transcription SREBP qui reconnaît les éléments de réponse SRE situés au niveau du promoteur de ces gènes (Goldstein et Brown, 1997). En présence de CsA ou de RAPA le LDL-R serait régulé par des mécanismes différents de l'HMGR. Son expression mais également son activité sont diminuées en présence de CsA (AlRayyes et coll, 1996 ; Winegar et coll, 1996). En effet, des études effectuées sur des animaux (rat, hamster) suggèraient que l'activité du LDL-R était régulée indépendamment de celle de l'HMGR dans le foie (Spady et coll, 1995). Les cellules HepG2, traitées par la CsA ont une capacité réduite de fixation, d'internalisation et de dégradation des LDL (Kaptein et

coll, 1994). Les travaux de Wasan et coll. (2002) sur des fibroblastes d'origine humaine ont également révélé une réduction de l'internalisation des LDL en présence de CsA. D'après leurs travaux, Winegar et coll. (1996) supposent que l'activité du LDL-R dans les cellules HepG2 est principalement régulée par la taille du pool intra-cellulaire de cholestérol libre et pas par la synthèse de 27-hydroxycholestérol. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de variations significatives de l'expression du récepteur des HDL, SR-BI, après traitement par la CsA ou la RAPA. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Vaziri et coll. (2000) effectués chez le rat.

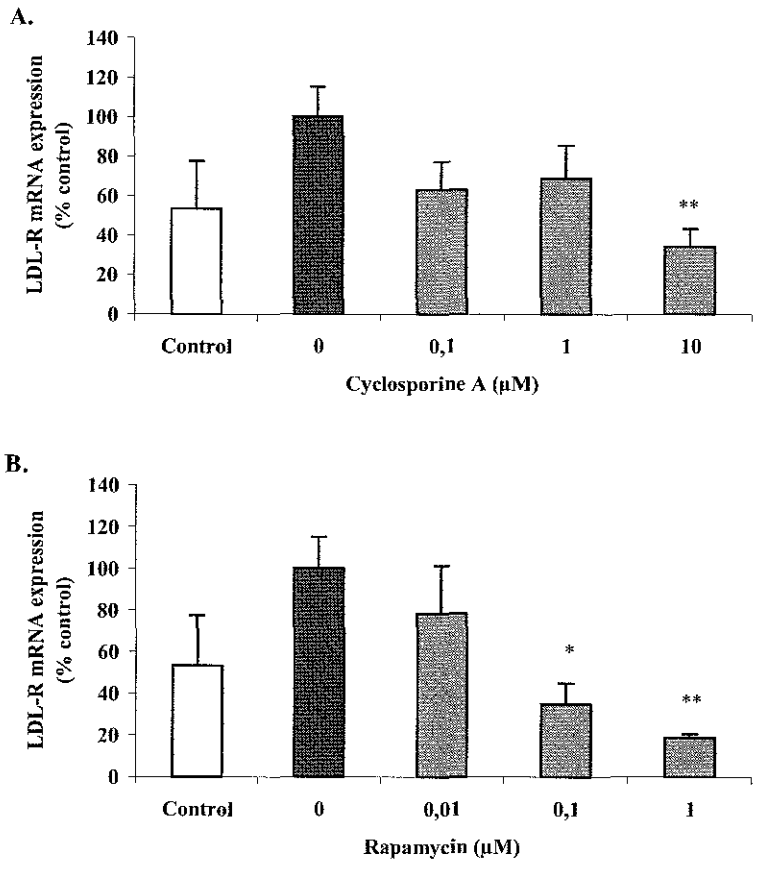


Figure 16 *: Effets de la CsA ou de la RAPA en présence de cholestérol (100µM) sur l'expression du LDL-R par les cellules HepG2*
**p<0.05, **p<0.01, significativement différent du groupe témoin par le test de Student*

Ces résultats expliqueraient en partie l'augmentation de LDL-cholestérol observée après un traitement immunosuppresseur. De plus, l'oxydation des LDL par les immunosuppresseurs pourrait également être envisagée sachant que la CsA et le TRL favoriserait également l'athérogenèse en augmentant l'oxydation des LDL (Apanay et coll, 1994).

Les VLDL sont après les chylomicrons les transporteurs majeurs des triglycérides qui sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase. Vaziri et coll (2000) ont fait l'hypothèse que l'hypertriglycéridémie et l'augmentation des VLDL observées chez les patients traités par la CsA serait dues à une déficience de la LPL. La découverte du récepteur des VLDL (VLDL-R) appartenant à la large famille des récepteurs des LDL a permis d'éclaircir cette voie jusqu'alors méconnue de clairance des VLDL (Takahashi et coll, 1992). Ainsi, l'hypertriglycéridémie pourrait également être causée par une déficience du VLDL-R. Bien que l'administration de CsA chez le rat ne conduise pas à une modification d'expression du VLDL-R (Vaziri et coll, 2000), les immunosuppresseurs CsA et RAPA pourraient modifier l'activité de ce récepteur. En effet, des études cinétiques montrent que un traitement par la RAPA diminue la clairance des VLDL et des LDL du plasma (Blum, 2002).

Aucune équipe n'avait envisagé l'étude de ABCA1, après un traitement immunosuppresseur. Nous montrons dans cet article une augmentation de l'expression de ABCA1 en présence de CsA alors que la RAPA n'a quasiment pas d'effet sur son expression (***Figure 17***). L'expression de ABCA1 dans les macrophages est stérol dépendante : l'accumulation de cholestérol cellulaire augmente la quantité d'ARNm de la protéine ABCA1 (Repa et coll, 2000c, Lawn et coll, 1999). Ce mécanisme actif d'efflux de cholestérol vers les HDL a été caractérisé dans les fibroblastes et les macrophages et implique différentes apolipoprotéines telles que les apoAI, apoAII et apoE (Rothblat et coll, 1999 ; Yokoyama et coll, 1995 ; Takanashi et coll, 1999).

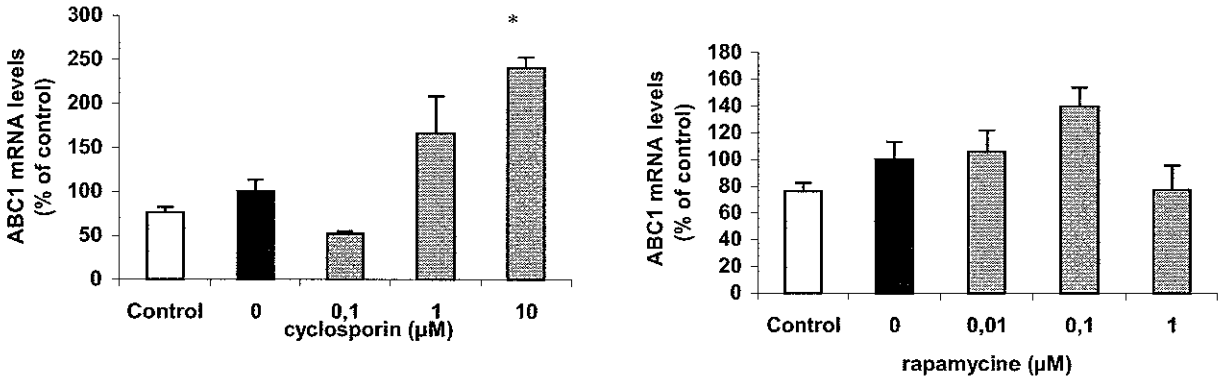


Figure 17 *: Effets de la CsA ou de la RAPA en présence de cholestérol (100µM) sur l'expression de ABCA1 par les cellules HepG2*
**p<0.05, significativement différent du groupe témoin par le test de Student*

On peut supposer qu'une augmentation de cholestérol intracellulaire stimulerait l'expression de ABCA1 dans les cellules HepG2. De plus, une étude récente réalisée dans des hépatocytes humains suggère que ABCA1 jouerait un rôle important dans la régulation de la concentration hépatique intra-cellulaire de cholestérol (Neufeld et coll, 2002). Comme nous l'avons vu auparavant, en présence de CsA ou de RAPA l'expression de l'HMGR est augmentée (***Figure 13***) et pourrait conduire à une augmentation de la synthèse de cholestérol et à son accumulation intracellulaire.

Les dosages de cholestérol et de triglycérides dans les surnageants cellulaires ne nous ont pas permis d'établir un parallèle avec les variations observées lors d'essais cliniques. Le dosage des triglycérides n'était pas réalisable dans les milieux de culture concentrés du fait de la présence de glycérol dans les Centriplus utilisés pour la concentration. La concentration de triglycérides dans les milieux de culture « pur » étant faible donc à la limite du seuil de détection, les éventuelles variations après administration de CsA ou de RAPA n'ont pas pu être observées. En effet, les triglycérides sont essentiellement d'origine alimentaire et les cellules étant cultivées dans un milieu sans sérum, elles sécrètent peu de triglycérides. Le dosage de la concentration de cholestérol donne des résultats contrastés. Apparemment, le taux de cholestérol total dans les surnageants cellulaires est diminué en présence de CsA (**Figure 18** ; Kaptein et coll, 1994) alors que la RAPA ne modifie pas de façon significative la concentration de cholestérol. Cette diminution de l'accumulation extracellulaire de cholestérol en présence de CsA pourrait s'expliquer par une augmentation intra-cellulaire et un défaut d'excrétion due aux modifications de production de certaines apolipoprotéines. Une augmentation du cholestérol intracellulaire est en accord avec la répression de l'expression du LDL-récepteur et une augmentation de l'expression de l'HMGR que nous avons observées.

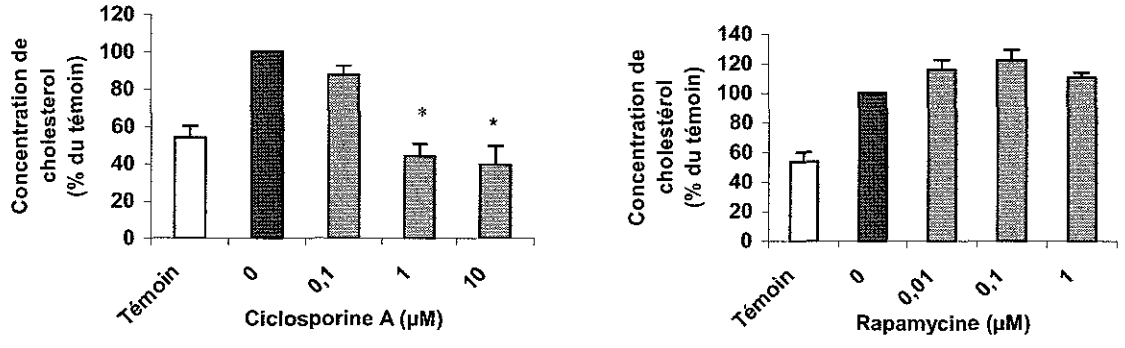


Figure 18 *: Effet de la CsA et de la RAPA sur la concentration de cholestérol extra-cellulaire *p<0.05, significativement différent du groupe témoin par le test de Student*

La dernière partie expérimentale de ce travail concerne le dosage d'apolipoprotéines (apo) majeures qui jouent un rôle clé dans le transport et l'élimination du cholestérol et des triglycérides. Elles servent de ligands à différents récepteurs de lipoprotéines (LDL-R, SRBI) et peuvent également intervenir comme coactivateurs du métabolisme du cholestérol et des triglycérides.

Ainsi, l'apoB qui est l'apo majeur des chylomicrons et des LDL, et l'apoE, préférentiellement retrouvé dans les LDL et les VLDL, reconnaissent le LDL-R favorisant le catabolisme des lipoparticules LDL riches en cholestérol. La sécrétion d'apoB par les cellules HepG2 est fortement diminuée après un traitement par la CsA ***(Figure 19)***. Ces résultats confirment les travaux précédents qui émettaient l'hypothèse d'un défaut de translocation de l'apoB à travers les membranes (Macri et coll, 1997) et non pas d'une diminution du taux d'ARNm d'apoB (Kaptein et coll, 1994). De plus, nous avons montré que cet effet serait dépendant du temps et de la dose de CsA administrée (**Figure 18**). Au contraire, la RAPA n'aurait pas d'effet significicatif sur la sécrétion d'apoB.

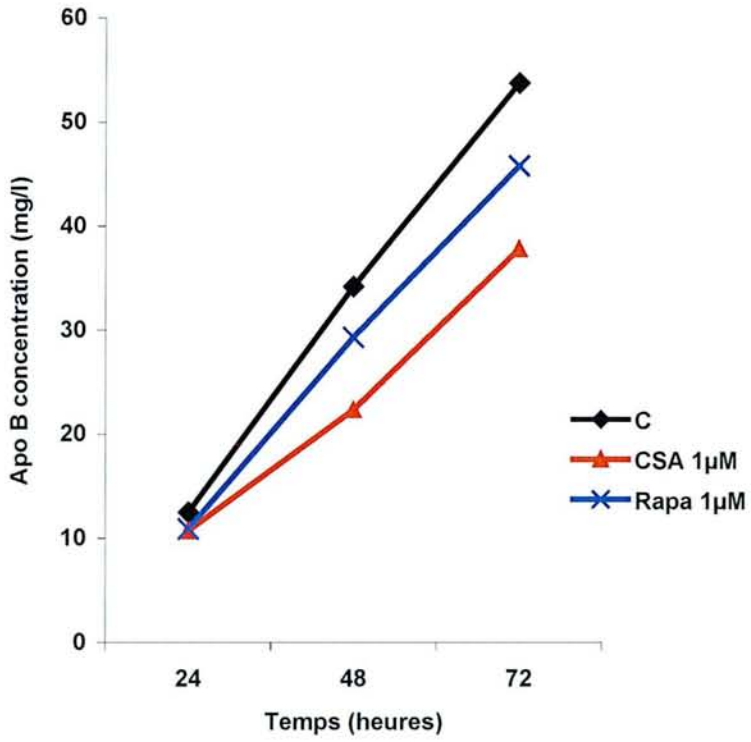


***Figure 18**: Effets dépendant du temps de la ciclosporine A (1µM) et de la rapamycine (1µM) sur la sécrétion d'apolipoprotéine B par les cellules HepG2*

La sécrétion d'apoAI est également diminuée par l'administration de CsA (***Figure 19***) en accord avec les études effectuées lors des essais cliniques (von Ahsen et coll, 1997 ; Gonzalez-Amieva et coll, 2000) ce qui pourrait également affecter la reconnaissance des HDL par SR-BI ou la formation proprement dite des HDL à l'aide de ABCA1.

Concernant l'apoE, sa concentration dans les surnageants cellulaires ne varie pas de façon significative (***Figure 19***) conformément à ce qui a été observé chez les patients traités par la RAPA (Segarra et coll, 1995) alors q'une étude rapporte une augmentation d'apoE après traitement par la CsA (Ichimaru et coll, 2001).

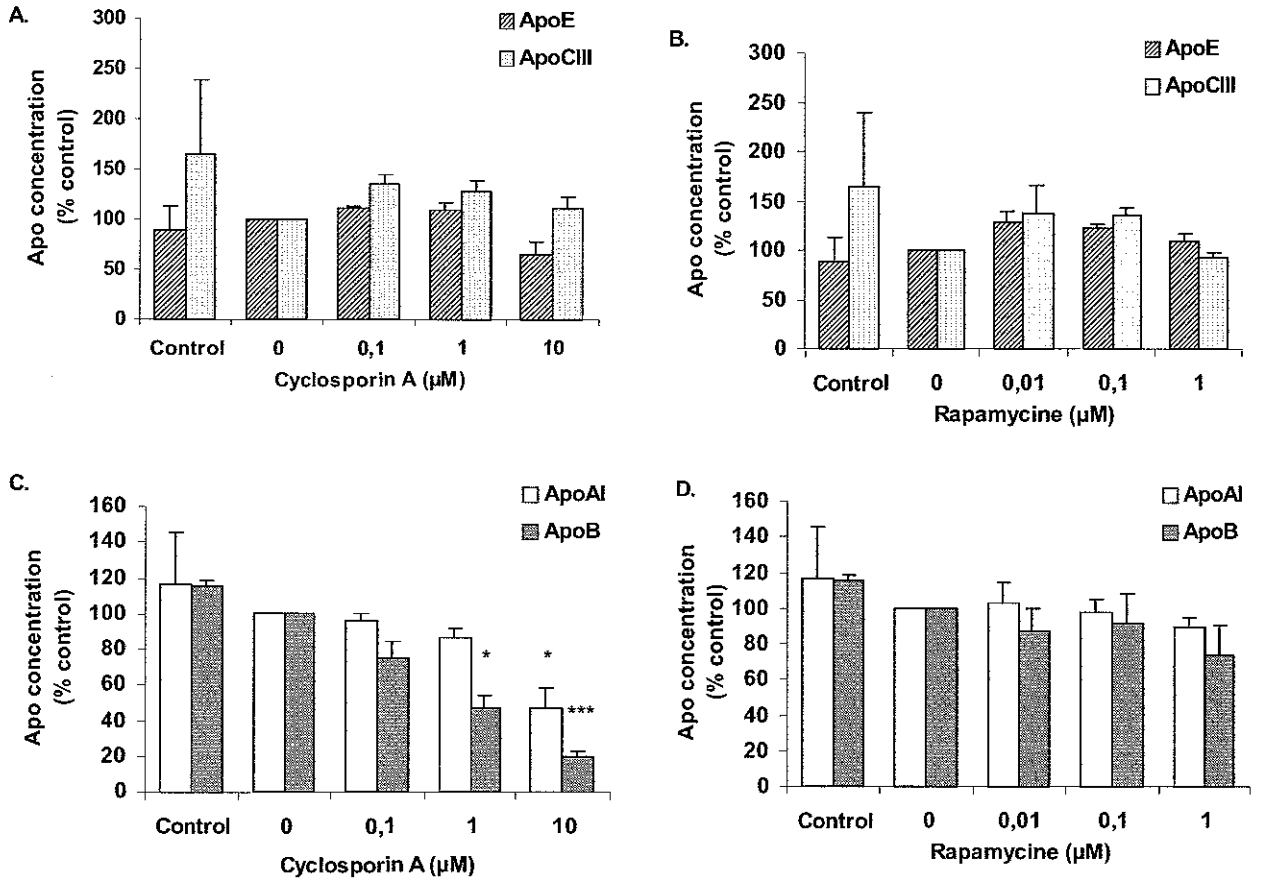


Figure 19 *: Effet de la Ciclosporine A et de la Rapamycine sur la secrétion d'apolipoprotéines AI, B100, CIII et E par les cellules HepG2*
p<0.05,*p<0.001 significativement différent du groupe témoin par le test de Student*

Il en est de même pour l'apoCIII, toutefois, lors des différents essais cliniques la concentration plasmatique d'apoCIII est significativement augmentée après traitement des patients par la RAPA, la CsA mais également le TRL (Tur et coll, 2000 ; Ichimaru et coll, 2001 ; Morrisett et coll, 2002). Les différences observées entre les essais cliniques et les

études que nous avons effectuées sont vraissemblablement dues aux limites du modèle utilisé. L'apoCIII est un inhibiteur de la LPL qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides. Ainsi, l'hypertriglycéridémie observée après un traitement immunosuppresseur pourrait être causé par l'augmentation plasmatique d'apoCIII. Néanmoins, selon Wu et coll. (1999b) l'hypertriglycéridémie observée en clinique serait en partie la conséquence d'une augmentation de la synthèse des acides gras puis des triglycérides du fait de l'activation de la FA (fatty acid synthase). Ils font également l'hypothèse que la diminution de la concentration intra-cellulaire de 27-hydroxycholestérol par l'action de la CsA serait responsable de l'activation de SREBP2 et ainsi de l'activation de nombreux gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et des triglycérides.
Les variations de secrétions des différentes apolipoprotéines que nous avons observées peuvent avoir diverses conséquences. Ainsi, la CsA diminue la sécrétion d'apoB, ce qui combiné à la diminution de LDL-R pourrait altérer la fixation des LDL sur leur récepteur, donc l'augmentation de LDL-C plasmatique. Le transport inverse du cholestérol par les HDL et leur capture par le foie pourrait également être altérée par la CsA du fait de la diminution de la sécrétion d'apoAI.

En conclusion, après traitement par les immunosuppresseurs, les modifications de production de certaines apolipoprotéines et d'expression ou d'activité de récepteurs de lipoprotéines seraient responsables de perturbations importantes du transport du cholestérol mais également des triglycérides. Ainsi, l'altération de l'homéostasie lipidique qui en découle jouerait un rôle important dans l'hyperlipidémie post-transplantatoire observée chez de nombreux patients traités par ces immunosuppresseurs.

PUBLICATION N°2

Effect of rapamycine and cyclosporine on cholesterol transport and major apolipoproteins secretion by HepG2 cells

GUEGUEN Y, FERRARI L, BATT A-M, VINCENT-VIRY M, SIEST G AND VISVIKIS S.

En preparation

Effects of rapamycin and cyclosporine on the cholesterol transport and secretion of major apolipoproteins in Hep G2 cells

Yann GUEGUEN[1], Luc FERRARI[1]*, Anne-Marie BATT[1], Monique VINCENT-VIRY[2], Gérard SIEST[1] and Sophie VISVIKIS[1]

[1]INSERM U525, Université Henri Poincaré - Nancy 1, 30 Rue Lionnois, 54000 Nancy France
[2]Centre de Médecine Préventive, 2 avenue du Doyen Jacques Parisot, 54501 Vandoeuvre-les-Nancy, France

***Corresponding author** :
Dr Luc Ferrari
INSERM U525 (Equipe 4)
Université Henri Poincaré, NANCY 1
30, rue Lionnois, 54 000 Nancy, FRANCE
Tel : 33 (0)3 83 68 21 79
Fax : 33 (0)3 83 32 13 22
E-mail : Luc.Ferrari@pharma.uhp-nancy.fr

Abbreviations : ABC, ATP Binding Cassette; CsA, cyclosporine A; HMGR, HMG-CoA réductase; LDL-R, LDL receptor, RAPA, rapamycin; SRBI, scavenger receptor class BI.

Abstract

Rapamycin and cyclosporine are both immunosuppressive drugs that cause hyperlipidemia in transplant treated patients. The liver is a key element in the control of the concentrations of plasma cholesterol and triglycerides. In addition to their major role in cholesterol synthesis and degradation into bile acids, hepatocytes express lipoprotein receptor and various apolipoproteins, which are important in cholesterol transport and cholesterol uptake. The aim of this study was to elucidate the possible causes of elevated cholesterol in patients treated with cyclosporine or rapamycin. HepG2 cells, a well-differentiated cell-line of hepatoma cells, were cultured and used as a model for *in vitro* lipoprotein receptors expression and apolipoprotein regulation. The results showed that cyclosporine and rapamycin reduced LDL-receptor expression whereas HDL receptor expression, SR-BI, was unaffected. In addition, only cyclosporine treated HepG2 cells had an increased ABCA1 expression, which is an important efflux cholesterol transporter. ApoB secretion was strongly diminished by cyclosporine administration which, combined with decreased LDL-R, could contribute to reduce the catabolism of LDL in the liver and to increase LDL-cholesterol level in plasma. The conclusion of this study is that cyclosporine and rapamycin induced partially distinct profile of dyslipidemia, by differently affecting cholesterol transport and uptake.

Keywords : Immunosuppressive drugs, cholesterol, lipoprotein receptor, apolipoprotein

Introduction

The success of organ transplantation has been revolutionized by cyclosporine A (CsA) treatment because of its immunosuppressive activity (Kahan et al, 1993). Rapamycin (RAPA, sirolimus) is a new immunosuppressive drug that does not seem to cause neurotoxicity or nephrotoxicity as commonly seen in patients treated with CsA or tacrolimus (Morelon et al, 2001). Originally described as an antibiotic of the macrolide family (Kay et al, 1989), the immunological activity of RAPA has been developed only recently while its structure resembles that of tacrolimus. Hyperlipidemia is a common side effect to immunosuppressive drugs such as cyclosporine A (CsA) and rapamycin (RAPA, sirolimus) (Brattström et al, 1998; Paul et al, 1998). This pathological change may be one of the many reasons for the increased cardiovascular morbidity and mortality associated with solid organ transplantation (Kasiske et al, 1988). In this work we expect to identify the pathways altered by CsA and RAPA, and especially the cholesterol transport, to elucidate the mechanism of CsA and RAPA-induced dyslipoproteinemia.

The liver is a key element in the control of plasma cholesterol, which is determined by (1) the cholesterol synthesis controlled by microsomal enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR), (2) the rate of removal of LDL from the circulation, regulated by hepatic LDL receptor (LDL-R) (Brown and Goldstein, 1986), cholesterol reverse transport regulated by HDL receptor SRBI (Scavenger receptor class BI) (Rigotti et al, 1997) and cholesterol efflux largely controlled by the ABCA1 membrane glycoprotein transporter (Tall et al, 2002), (3) the degradation and elimination of cholesterol from the body by synthesis of bile acids essentially controlled by cytochrome P450 enzyme, CYP7A1 (neutral pathway) and CYP27A1 (acidic pathway) (Chiang, 1998).

The liver is responsible for about two thirds of the catabolism of LDL (Havel and Hamilton, 1988). Because the uptake of LDL occurs mainly through LDL receptors, the LDL receptor is the most important component in the tightly maintenance of cholesterol homeostasis in the body (Brown and Goldstein, 1986). Among other more recently characterized major regulatory components, cholesterol efflux regulatory protein (the product of the ABCA1 gene) and the SRBI receptor are important molecules, which must also be analysed. The transport and the elimination of cholesterol and triglycerides by lipoproteins are largely

controlled by apolipoproteins (apo), which serves as ligand of these lipoprotein receptors or coactivator for the metabolism of cholesterol or triglycerides. Then apoB, the main apoprotein of chylomicrons and LDL, and apoE, preferentially found in LDL and VLDL, recognize the LDL-R, enhancing catabolism of the pro-atherogenic lipoprotein LDL-C. ApoAI, the major apoprotein component of HDL, is a cofactor of lecithin cholesterol acyltransferase, which is responsible for the formation of most cholesteryl esters in plasma. ApoAI also promotes efflux of cholesterol from cells by HDL formation, mediated by ABCA1 (McNeish et al, 2000), and interaction with cell surface HDL receptor, SRBI (Rigotti et al, 1997). ApoCIII is an antagonist of plasma triglyceride catabolism, so altered apoCIII levels may also contribute to the atherogenic lipoprotein profile observed after RAPA treatment (Tur et al, 2000; Morrisett et al, 2002).

Available data on the mechanisms of RAPA-induced dyslipidemia are limited. We considered that a study of the key lipid-regulatory factors might help to uncover the molecular basis of RAPA-induced hyperlipidemia compared to CsA. To this aim we explored the effect of RAPA and CsA treatment on LDL-R, SRBI and ABCA1 mRNA expressions and apolipoprotein AI, B, E and CIII secretions in HepG2 cells.

Materials and methods

Materials

Human hepatoblastoma HepG2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Cell culture medium RPMI 1640, L-Glutamine, antibiotics and cholesterol were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Fetal calf serum (FCS) was from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Plasticware used for cell culture were from Costar (Cambridge, MA).

Cell Culture

The HepG2 cells were grown to confluence in T-75 flasks at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Cell culture medium was supplemented with 10 % FBS, glutamine 4mM and antibiotic 1 % (penicillin, streptomycin, amphotericin). After development in flasks, cells were seeded onto six-wells plates at a density of 6.10^5 cells/well for RNA analysis. At confluence, cells were washed with RPMI without FBS during 24 hours to remove traces of FBS. Cells were then incubated in fresh DMEM in the presence or not of cholesterol water-soluble (Sigma) and cells exposed to cholesterol are concomitantly treated with immunosuppressive drugs (CsA or RAPA) for up to 72 hours. The culture medium was collected at 24,48 and 72 hours and frozen at -20°C until needed for apolipoproteins analyses. Cells were recovered for RNA isolation.

RNA isolation

Isolation of total RNA was performed by guanidinium-thiocyanate (GTC)/phenol mixture based on the technique described by Chomezynski and Sacchi (1987) according to the manufacturer's instructions with RNA Instapure (Eurogentec, Philadelphia, PA). Quantification of RNA was obtained by optical density at 260 nm and was expressed by µg/ml. The integrity of the total RNA was checked by performing denaturating electrophoresis in 1% agarose gel.

Reverse transcription

Equal quantity (3 µg) of total RNA isolated from HepG2 cells were mixed, denatured for 5 min at 65°C and reverse transcripted in a final volume of 50µl containing 50mM TrisHCl, 75mM KCl, 3mM $MgCl_2$, 10mM dithiotreitol, 1mM each deoxynucleotides, 40 units RNAsine, 0.5µl BSA 100X, 5 ng oligo-dt and 200 units MMLV reverse transcriptase. The mixture was incubated 2 hours at 37°C and the enzyme was then inactivated by heating for 2 min at 95°C.

Polymerase chain reaction

The cDNA mixture was diluted 1/50 for the real time PCR (LightCycler, Roche, Basel, Switzerland). The PCR protocol (FastStart DNA Master SYBR Green I), according to the manufacturer's instructions, needed to be adapted to the reaction conditions. The final concentrations of the primers used were 0.2µM with RNA18S, 0.3µM with GAPDH and ABCA1, 0.4µM with LDL-R and SR-BI. The elongation time depended on the size of the amplicon (25 bp/sec).

The quantification of the PCR products was made by relative quantification; the expression of the target gene was determined as a ratio to a housekeeping gene (GAPDH).

Table 1 : Primers sequences used for PCR

Genes	Sequences	References
GAPDH forward	5' CCATCACCATCTTCCAGGAG 3'	Andreou et al, 1998
GAPDH reverse	5' GGATGATGTTCTTCCAGGAG 3'	
LDL-R forward	5' CTCAAGCATCGATGTCAATG 3'	Shoda et al, 1995
LDL-R reverse	5' AGCTCTGGCAGGCAATGCT 3'	
ABCA1 forward	5' TGTCCAGTCCAGTAATGGTTCTGT 3'	Fu et al, 2001
ABCA1 reverse	5' AAGCGAGATATGGTCCGGATT 3'	
SR-BI forward	5' CGTCGCCGTCCCCGTCTCCTGCCAG 3'	Xu et al, 2001
SR-BI reverse	5' CTTAAGGACCTGCTGCTTGATGAGC 3'	

Apolipoproteins concentrations

The concentrations of apoAI and apoB were measured by nephelometry using BNII analyser from Dade-Behring (Rueil-Malmaison, France) whereas apoE and apoCIII concentration were quantified by turbidimetry using a Cobas autoanalyser with Daiichi reagents (Kyoto, Japan).

Statistical analysis

Each experiment was performed in triplicates and repeated at least once in an independent setting. Data shown are the mean ± SE after treatment with CsA or RAPA at various concentration. Values were compared using the Student's t-test, and were considered significant for a $p<0.05$.

Results

Increasing concentrations of CsA and RAPA, which were within the range of concentration found in humans treated with these immunosuppressants, were added to hepatoma cell line Hep G2.

The LDL-R, SR-BI and ABCA1 mRNA expression, were measured by real time PCR assays and relative quantification as a ratio to a housekeeping gene. The data obtained by semi-quantitative PCR on the levels of LDL receptor mRNA in the presence of CsA, RAPA and cholesterol are given in Figure 1. Cholesterol alone increased the expression of LDL-R compared to untreated cells as already reported by others. The addition of RAPA highly repressed LDL-R mRNA expression by 22, 65 and 82% when the cells were treated with 0.01, 0.1 and 1 μM whereas CsA repressed mRNA LDL-R by 35 and 66 % with 1 and 10 μM. Higher concentrations of CsA or RAPA for 48 hours had a toxic effect on HepG2 cells (data not shown).

Figure 2 shows the effects of CsA and RAPA on ABCA1 expression, a major cholesterol efflux transporter protein. CsA dose-dependently increased ABCA1 expression in HepG2 cells by 66 % and 140 % respectively with 1μM and 10μM (Fig. 2A). RAPA failed to significantly affect this pathway within the range of concentration used (0.01 to 1 μM) (Fig; 2B).

We measured the concentration of various apolipoproteins in HepG2 cell culture supernatant after treatment with immunosuppressives drugs CsA and RAPA. The apoB secretion was strongly lowered by CsA administration (Fig. 4C). The decreased apoB secretion was also dose-dependent and occurred simultaneously when LDL-R expression decreased. ApoAI was less diminished in the presence of CsA and was only significant with the higher concentration (Fig. 4A). Moreover, no significant change of SR-BI expression was observed after CsA or RAPA administration (Fig. 3). In contrast, in RAPA treated HepG2 cells, we observed a slight non-significant decrease of apoB and apoAI by HepG2 cells within the range of concentration used (Fig. 4D). In the same way as CsA, RAPA was devoid of any significant effects on apoE and apoCIII secretion in HepG2 cells (Fig. 4A and 4B)

Discussion

This study was undertaken in order to investigate the effects of CsA and RAPA on the expression of several genes involved in cholesterol transport in HepG2 cells, a widely used and convenient model for studies on the regulation of cholesterol biosynthesis and metabolism in the liver (Javitt, 1990). HepG2 is recognized as a suitable model, since it synthesizes apolipoproteins and lipoprotein receptors even if it is not a perfect model since it has a defect in lipid mobilization (Erikson and Fielding, 1986).

LDL is positively associated with the incidence of cardiovascular diseases, and therefore the catabolism of LDL has been well studied over years. Indeed, under normal conditions, as much as 80 % of the circulating LDL particles are cleared by the liver primarily through an LDL receptor mediated process (Dietshy et al., 1998). Moreover the LDL-R recognized apoB or apoE, the main apoprotein of LDL. CsA reduced LDL uptake and degradation in HepG2 cells mainly by inhibiting the LDL-R mediated pathway and the expression of LDL-R by about 40 % with 1μM (Figure 1A, AlRayyes et al, 1996). We used a range of concentrations reported in plasma concentration observed for RAPA (0.01-0.02μM) or CsA (0.5-5μM) after therapeutic treatment (McDonald et al, 2000; Frey et al, 1998). Indeed, Kaptein et al (1994) also showed that CsA treated HepG2 cells had reduced ability to bind, internalise and degrade LDL. In contrast, Vaziri et al (2000) hadn't observed any effect of CsA, in their rat model, on LDL-R. Concerning RAPA, we showed for the first time that this immunosuppressive drug also decreased LDL-R expression by about 65% with only 0.1 μM (Fig. 1B) suggesting that it will have a similar effect on LDL-R activity. Cholesterol and triglycerides are carried in the blood and in the intestinal fluid in association with apolipoproteins and form the lipoproteins. We and others have also shown that CsA addition to the culture medium resulted in a dose- and time-dependent decrease in apoB secretion from HepG2 cells (Fig. 4, Macri et al, 1997), but CsA did not affect the apoB mRNA level (Kaptein et al, 1994), indicating that CsA regulates the secretion of apoB at a translational or posttranslational level. These combined effects on the major receptor of LDL and the main apoprotein of LDL could contribute to elevate plasma LDL-cholesterol after treatment with CsA or RAPA.

Two different pathways cause the efflux of cholesterol from cells: the first is passive and promotes efflux from the cell membrane to HDL and the second is energy-dependent and apolipoprotein mediated (Rothblat et al, 1999). It was demonstrated that ABCA1 is a key

gene in this energy-dependant process because of its role in the initial step in HDL formation (Lawn et al, 1999). ABCA1 may also transport the excess of hepatic intracellular cholesterol into the plasma as seen in macrophages and fibroblasts (Rothblat et al, 1999; Yokoyama et al. 1998; Takahashi et al. 1999). Neufeld et al (2002) suggested that ABCA1 could play an important role in the regulation of the levels of intracellular hepatic cholesterol, as well as plasma HDL. We observed an increased ABCA1 expression after CsA administration in HepG2 cells, which could be due to an increased intracellular cholesterol concentration. Then, it would be followed by increased efflux of cholesterol by ABCA1. Indeed, Winegar et al (1996) reported an increase in cellular free cholesterol levels probably resulting from cyclosporine inhibition of both cholesterol esterification and cholesterol 27-hydroxylation.

HDL particles serve as carriers of cholesterol from peripheral tissues to the liver. The HDL-mediated reverse cholesterol transport plays a major role in the cardiovascular protection against arteriosclerotic cardiovascular disease. Cholesterol uptake by the liver through HDL particles depends on the availability of the hepatic HDL receptor, SRBI (Acton et al, 1996). In addition, SRBI facilitates the hydrolysis of HDL-born triglycerides by hepatic lipase and fatty acids uptake by hepatocytes. Because chronic CsA and RAPA administration can result in vasculopathy, we wondered whether CsA therapy affects SRBI expression. The results of this study showed no significant difference between CsA, RAPA treated and cholesterol free HepG2 cells on SR-BI expression (Fig. 3) as observed by Vaziri et al (2000) for CsA. However the available data do not allow any conclusion about the SR-BI receptor function. But, decreased apoAI secretion observed in this study (Fig. 4), could contribute to alter receptor ligand interaction and to decrease the anti-atherogenic effect of HDL, partially mediated by its major apoprotein constituent apoAI. In RAPA treated cells, apolipoprotein secretions were not significantly altered (Fig. 4) while different clinical studies reported plasmatic variations of apoB100 and apoCIII (Hoogeven et al, 2001; Tur et al, 2000; Morrisett et al, 2002) which could participate in increased triglycerides levels. In addition, the hypertriglyceridemia observed in many patients treated with RAPA could be explained by decreased LDL-R expression and activity and changes in triglycerides metabolism.

To summarize, we demonstrated that CsA and RAPA repressed the expression of LDL-R, which could be a cause for the widely reported hypercholesterolemia described after an immunosuppressive treatment. Simultaneously, the induction of ABCA1 by CsA would increase the circulating cholesterol concentration. In addition to these events, a decrease in

apoAI excretion by HepG2 cells following CsA treatment is another mechanism, which could be involved in this secondary effect of CsA. RAPA didn't alter ABCA1 and apolipoproteins, suggesting that these mechanisms would not be involved.

References

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M, 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271(5248),518-20.

Andreou ER, Prokipcak RD, 1998. Analysis of human CYP7A1 mRNA decay in HepG2 cells by reverse transcription-polymerase chain reaction. Arch Biochem Biophys 357(1),137-46.

Brattström, C, Wilczek, HE, Tyden, G, Bottiger, Y, Sawe, J and Groth, CG, 1998. Hypertriglyceridemia in renal transplant recipients treated with sirolimus. Transplantation Proceedings 30,3950-3951.

Brown MS, Goldstein JL, 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232(4746),34-47.

Chiang JYL, 1998. Regulation of bile acid synthesis Front Biosci. 3,D176-93.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK, 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. J Lipid Res 34(10),1637-59.

Erickson SK, Fielding PE, 1986. Parameters of cholesterol metabolism in the human hepatoma cell line, Hep-G2.. J Lipid Res 27(8),875-83.

Frey, FJ, Horber, FF. and Frey, BM, 1988; Trough levels and concentration time curves of cyclosporine in patients undergoing renal transplantation. Clinical Pharmacology & Therapeutics 43,55-62.

Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, Lund EG, 2001. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. J Biol Chem 276(42),38378-87.

Havel RJ, Hamilton RL, 1988. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. Hepatology 8(6),1689-704.

Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Pownall HJ, Opekun AR, Hachey DL, Jaffe JS, Oppermann S, Kahan BD, Morrisett JD, 2001. Effect of sirolimus on the metabolism of apoB100-containing lipoproteins in renal transplant patients. Transplantation 72(7),1244-50.

Javitt, N.B, 1994, Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways. FASEB Journal 8,1308-1311.

Kahan BD, 1993. Cyclosporine: the base for immunosuppressive therapy--present and future. Transplant Proc 25:508-10.

Kasiske BL, 1988. Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. Am J Med 84(6),985-92.

Kaptein A, de Wit EC, Princen HM, 1994. Cotranslational inhibition of apoB-100 synthesis by cyclosporin A in the human hepatoma cell line HepG2. Arterioscler Thromb 14(5),780-9.

Kay, J.E., Benzie, C.R., Goodier, M.R., Wick, C.J. and Doe, S.E., 1989. Inhibition of T-lymphocyte activation by the immunosuppressive drug FK-506. Immunology 67,473-477.

Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF, 1999. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. J Clin Invest 104(8),R25-31.

MacDonald, A, Scarola, J, Burke, JT and Zimmerman, JJ, 2000. Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. Clinical Therapeutics 22, B101-121.

Macri J, Adeli K, 1997. Studies on intracellular translocation of apolipoprotein B in a permeabilized HepG2 system. J Biol Chem 272(11),7328-37.

McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL, 2000. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. Proc Natl Acad Sci U S A 97(8),4245-50.

Morelon E, Mamzer-Bruneel MF, Peraldi MN, Kreis H, 2001, Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation. Nephrol Dial Transplant 16(1),18-20.

Morrisett JD, Abdel-Fattah G, Hoogeveen R, Mitchell E, Ballantyne CM, Pownall HJ, Opekun AR, Jaffe JS, Oppermann S, Kahan BD, 2002. Effects of sirolimus on plasma lipids, lipoprotein levels, and fatty acid metabolism in renal transplant patients. J Lipid Res 43(8),1170-80.

Neufeld EB, Demosky SJ Jr, Stonik JA, Combs C, Remaley AT, Duverger N, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr, 2002, The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun 297(4):974-9.

Paul LC, 1998, Adverse effects of immunosuppressive drugs on long-term graft outcome. Transplant Proc 30(8),4001-4.

Rayyes OA, Wallmark A, Floren CH, 1996. Cyclosporine inhibits catabolism of low-density lipoproteins in HepG2 cells by about 25%. Hepatology. ;24(3),613-9.

Rigotti A, Trigatti B, Babitt J, Penman M, Xu S, Krieger M, 1997. Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein. Curr Opin Lipidol. 8(3),181-8.

Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC, 1999. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. J Lipid Res 40(5),781-96.

Shoda J, He BF, Tanaka N, Matsuzaki Y, Osuga T, Yamamori S, Miyazaki H, Sjovall J, 1995. Increase of deoxycholate in supersaturated bile of patients with cholesterol gallstone disease and its correlation with de novo syntheses of cholesterol and bile acids in liver, gallbladder emptying, and small intestinal transit. Hepatology 21(5),1291-302.

Takahashi Y, Smith JD, 1999 Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci USA 96(20),11358-63.

Tall AR, Costet P, Wang N, 2002 Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. J Clin Invest 110(7),899-904.

Tamasawa N, Hayakari M, Murakami H, Matsui J, Suda T, 1997, Reduction of oxysterol levels up-regulates HMG-CoA reductase activity in rat liver. Atherosclerosis. 131(2),237-42.

Tur MD, Garrigue V, Vela C, Dupuy AM, Descomps B, Cristol JP, Mourad G, 2000. Apolipoprotein CIII is upregulated by anticalcineurins and rapamycin: implications in transplantation-induced dyslipidemia. Transplant Proc 32(8),2783-4.

Vaziri ND, Liang K, Azad H. Effect of cyclosporine on HMG-CoA reductase, cholesterol 7alpha-hydroxylase, LDL receptor, HDL receptor, VLDL receptor, and lipoprotein lipase expressions. J Pharmacol Exp Ther. 2000 ;294(2):778-83.

Winegar, DA, Salisbury, JA, Sundseth, SS and Hawke, RL, 1996, Effects of cyclosporine on cholesterol 27- hydroxylation and LDL receptor activity in HepG2 cells. Journal of Lipid Research 37, 179-191.

Xu N, Ekstrom U, Nilsson-Ehle P, 2001. ACTH decreases the expression and secretion of apolipoprotein B in HepG2 cell cultures. J Biol Chem 276(42), 38680-4.

Yokoyama S, 1998. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. Biochim Biophys Acta 1393(1), 222.

Acknowledgements

Y. Gueguen was supported by the Région Lorraine. The authors will thank Wyeth-Ayerst for the generous gift of rapamycin and for financial support of the research. The authors acknowledge Dr Philippe Bertrand and the technical staff of the Center of Preventive Medicine for apolipoproteins measurement.

Legends for figures

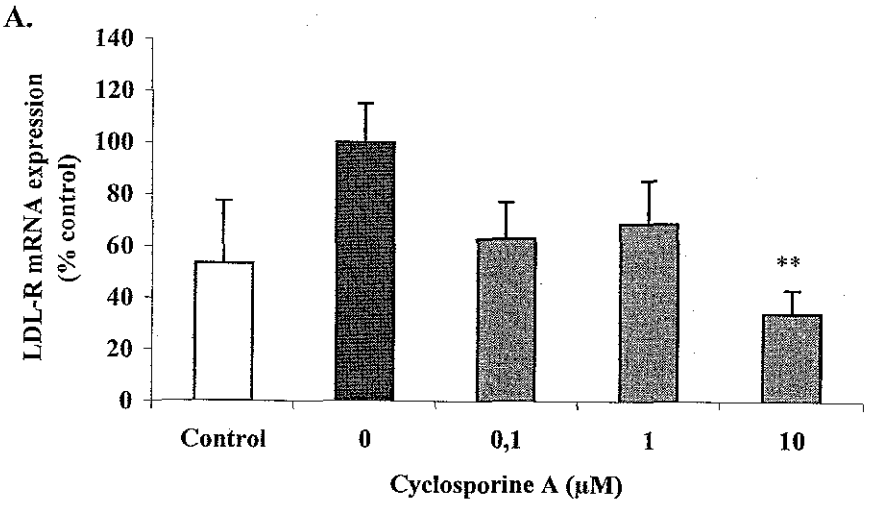
Figure 1 : Effect of **(A)** cyclosporine (0.1 to 1 μM) and **(B)** rapamycin (0.01 to 1 μM) on LDL-R mRNA levels in HepG2 cells in the presence of cholesterol (100μM) after 72h. Data shown are the mean ± SE of three different experiments (n = 3 for each group) LDL-R mRNA levels after treatment with CsA or RAPA. ** $p<0.01$, * $p<0.05$, significantly different from the cholesterol group by the Student t test.

Figure 2 : Effect of **(A)** cyclosporine (0.1 to 1 μM) and **(B)** rapamycin (0.01 to 1 μM) on ABCA1 mRNA levels in HepG2 cells in the presence of cholesterol (100μM) after 72h. Data shown are the mean ± SE of two different experiments (n = 3 for each group) ABCA1 mRNA levels after treatment with CsA or RAPA. ** $p<0.01$, * $p<0.05$, significantly different from the cholesterol group by the Student t test.

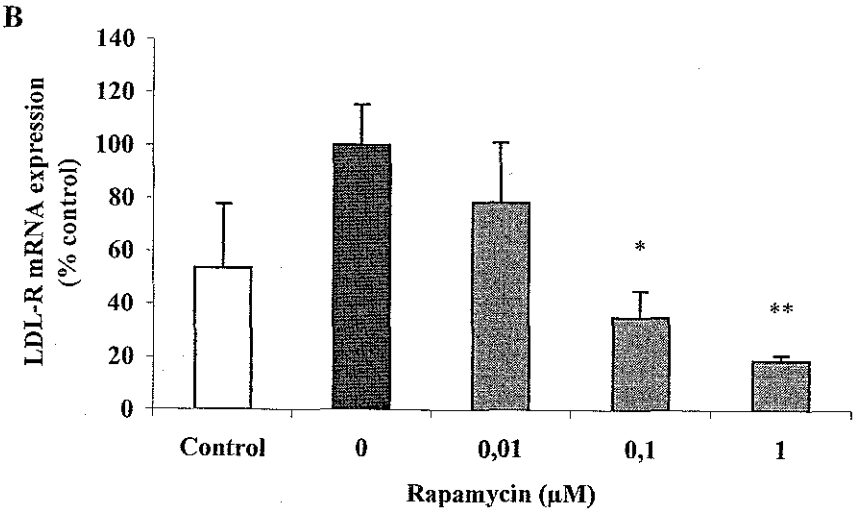
Figure 3 : Effect of **(A)** cyclosporine (0.1 to 1 μM) and **(B)** rapamycin (0.01 to 1 μM) on SR-BI mRNA levels in HepG2 cells in the presence of cholesterol (100μM) after 72h. Data shown are the mean ± SE of two different experiments (n = 3 for each group) SR-BI mRNA levels after treatment with CsA or RAPA.

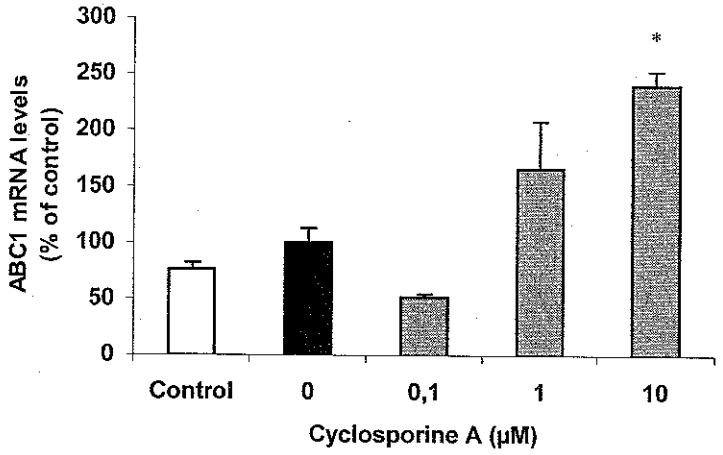
Figure 4 : Effect of **(A)** cyclosporine and **(B)** rapamycin on apolipoprotein AI, B, CIII and E secretion by HepG2 cells. HepG2 cells were incubated in RPMI without FCS supplemented with cholesterol (100μM) and increasing concentrations of cyclosporine (0.1 to 1 μM) or rapamycin (0.01 to 1 μM) for 72 hours. Secreted apolipoproteins were quantified as described in materials and methods and expressed as % of cholesterol free cells. Data shown are the mean ± SE of three different experiments after treatment with CsA or RAPA.

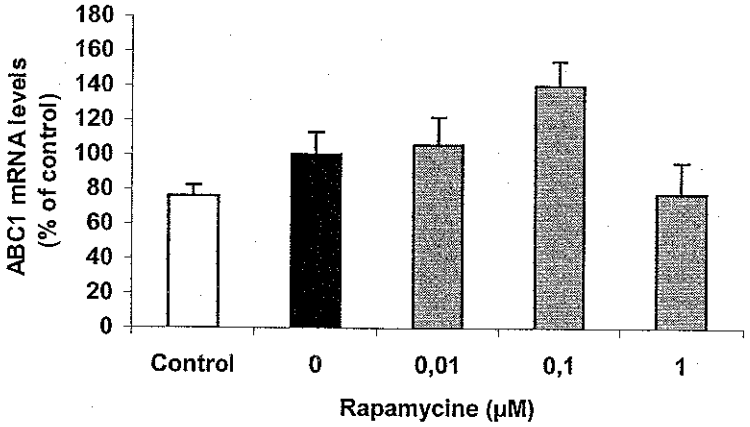
A.

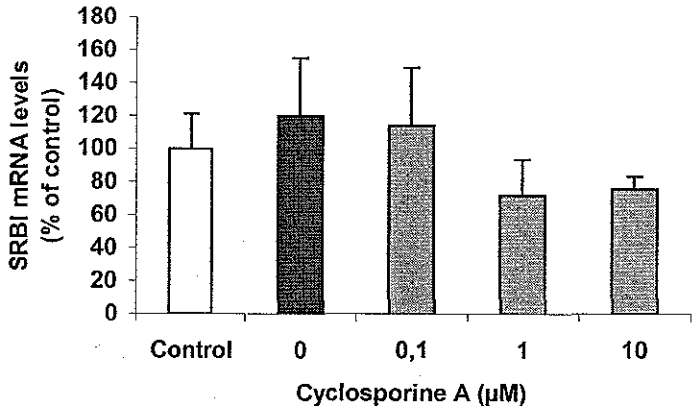

LDL-R mRNA expression
(% control)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
Control
0
0,1
1
10
Cyclosporine A (µM)

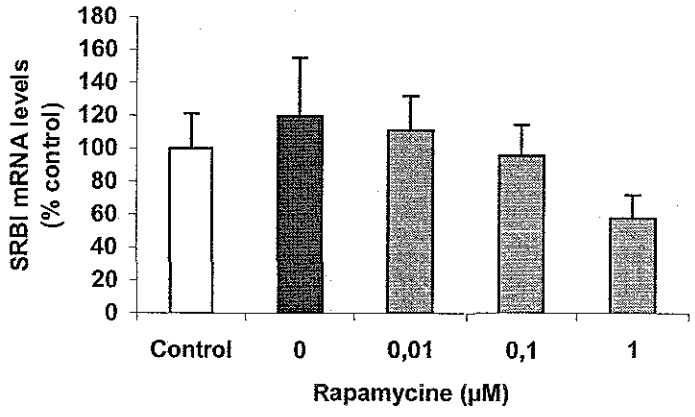
B

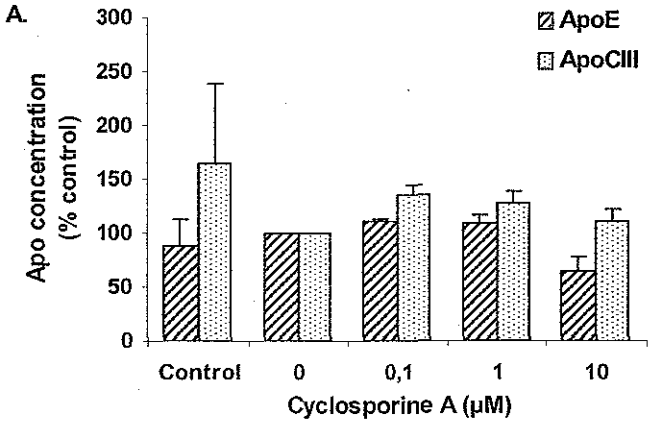

LDL-R mRNA expression
(% control)
140
120
100
80
60
40
20
0
*
**
Control
0
0,01
0,1
1
Rapamycin (µM)

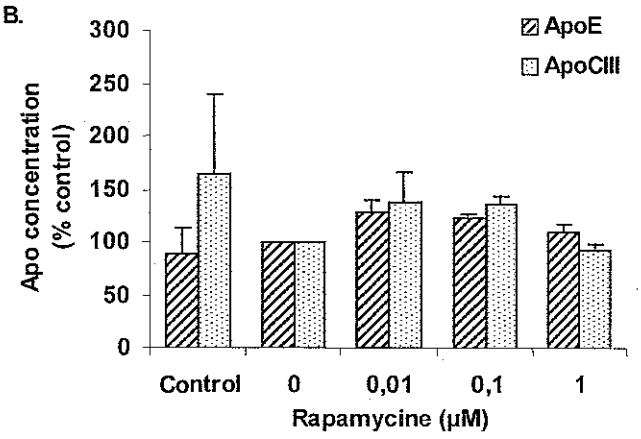

300
250
200
150
100
50
0
ABC1 mRNA levels
(% of control)
*
Control
0
0,1
1
10
Cyclosporine A (µM)

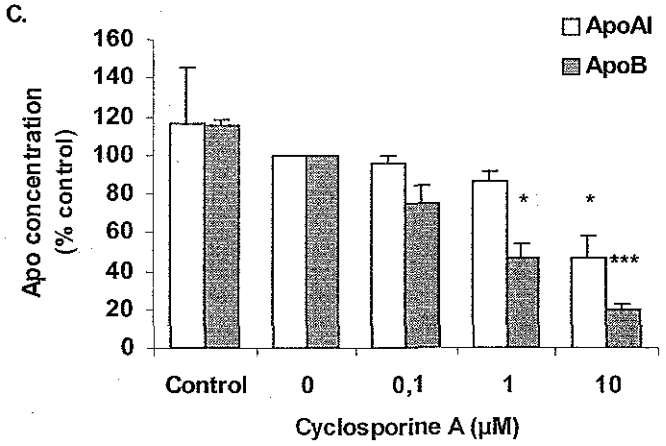

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ABC1 mRNA levels
(% of control)
Control
0
0,01
0,1
1
Rapamycine (µM)

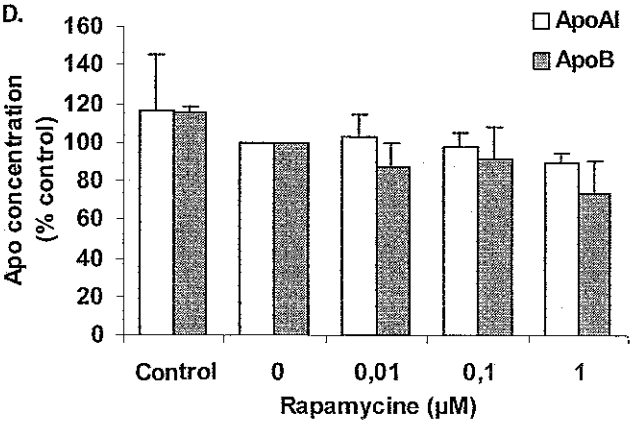

SRBI mRNA levels
(% of control)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
0
0,1
1
10
Cyclosporine A (µM)


SRBI mRNA levels
(% control)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
0
0,01
0,1
1
Rapamycine (µM)


A.
ApoE
ApoCIII
Apo concentration (% control)
300
250
200
150
100
50
0
Control
0
0,1
1
10
Cyclosporine A (µM)


B.
ApoE
ApoCIII
Apo concentration (% control)
300
250
200
150
100
50
0
Control
0
0,01
0,1
1
Rapamycine (µM)


C.
ApoAI
ApoB
Apo concentration (% control)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
*
***
Control
0
0,1
1
10
Cyclosporine A (µM)


D.
ApoAI
ApoB
Apo concentration (% control)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
0
0,01
0,1
1
Rapamycine (µM)

IV. Effets de la ciclosporine A et de la rapamycine sur l'expression de différents récepteurs nucléaires impliqués dans l'homéostasie lipidique et le métabolisme des acides biliaires

IV.1. Effets de la CsA et de la RAPA sur l'expression de PXR

Le PXR est fortement exprimé dans le foie et l'intestin, des tissus dans lesquels le CYP3A est également exprimé et régulé. En effet, il existe de nombreux travaux démontrant le rôle majeur du PXR en tant que régulateur de l'expression du CYP3A. La famille CYP3A joue un rôle particulièrement important dans la métabolisation des xénobiotiques en facilitant leur élimination. Ces enzymes ont une large spécificité de substrats et sont notamment impliquées dans le métabolisme de la CsA et de la RAPA (Christians et Sewing, 1995 ; Lampen et coll, 1998 ; Sattler et coll, 1992). Bien que ces immunosuppresseurs soient des substrats potentiels du CYP3A, aucune variation de son expression n'a été observée dans notre modèle cellulaire (HepG2) en présence de CsA ou de RAPA à différentes concentrations (résultats non montrés).

L'expression de PXR a été évaluée après traitement des cellules HepG2 par la CsA ou la RAPA et ne varie pas de façon significative quelle que soit la dose d'immunosuppresseur administrée.

Par ailleurs, le PXR est un élément régulateur clé dans le contrôle de l'homéostasie des acides biliaires car il réprime leur synthèse et notamment le CYP7A1 tout en stimulant leur élimination par le CYP3A (Staudinger et coll, 2001) et leur transport par l'intermédiaire de MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) et OATP2 (organic anion transporting polypeptide). MRP2 fait partie de la famille des gènes ABC ; ce transporteur participe à l'efflux de divers composés conjugués à travers la membrane apicale des hépatocytes vers les canalicules biliaires. OATP2 permet le transport des acides biliaires conjugués du sang vers les hépatocytes ou ils seront hydroxylés par le CYP3A avant d'être excrétés dans la bile (Reichel et coll, 1999). Des travaux récents chez le rat ont montré une diminution du taux d'ARNm MRP2 en présence de CsA ou de RAPA alors que l'expression de OATP2 est augmentée par un traitement par la RAPA (Bramow et coll, 2001) qui pourrait conduire à une

accumulation de métabolites toxiques ou d'acides biliaires secondaires dans les hépatocytes. Afin de vérifier si les modifications d'expression de ces transporteurs des acides biliaires ne passent pas PXR, il serait nécessaire de vérifier si son activation tout comme son expression n'est pas modifiée. De plus, l'activation de PXR, comme l'activation de FXR, aboutit à une répression du CYP7A1 (Staudinger et coll, 2001) or aucune modification de l'expression du CYP7A1 n'est observée en présence de CsA ou de RAPA ce qui va dans le sens d'une abscence d'effet sur PXR ou FXR. Ces résultats sont cohérents avec l'abscence de modification de taux d'ARNm de PXR.

IV.2. Effets de la CsA et de la RAPA sur l'expression de LXRα

Le récepteur nucléaire LXR joue un rôle central dans l'homéostasie lipidique en contrôlant l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol et des acides biliaires mais également dans le métabolisme des lipoprotéines (Edwards et coll, 2002). La régulation coordonnée des acides gras et du métabolisme du cholestérol par LXR pourrait permettre à l'organisme de se protéger contre un excès de cholestérol.

ABCA1 est un gène cible de LXRα et serait induit en réponse à une accumulation de cholestérol ou d'oxystérols (Lawn et coll, 1999) aboutissant à l'efflux de cholestérol sous forme de lipoprotéines HDL dans des cellules d'origine murine (Schwartz et coll, 2000). Le cholestérol stimule également l'expression de ABCA1 dans le foie et l'intestin (Langman et coll, 1999) et l'activation par LXRα de ABCA1, démontrée dans les macrophages et les fibroblastes (Repa et coll, 2000c, Fu et coll, 2001 ; Costet et coll, 2000), pourrait également avoir lieu dans le foie. Nous avons observé une augmentation du taux d'ARNm ABCA1 (***Figure 17***) en parallèle à une augmentation des ARNm de LXRα en présence de CsA dans la lignée d'origine hépatique HepG2 (***Figure20***). Pourtant différentes études décrivent un effet tissu spécifique de l'induction de LXRα par différents agonistes et n'observent pas d'induction de LXRα en présence de différents agonistes dans des hépatocytes humains alors que dans le même temps ABCA1 est induit dans ces cellules (Whitney et coll, 2001).

Différentes hypothèses peuvent être émises quant à l'augmentation de l'expression de LXRα observée après traitement par la CsA : la forte inhibition de l'activité CYP27A1 et la diminution de la production de 27-hydroxycholestérol qui s'ensuit entraînerait une augmentation de la production d'autres oxystérols davantage susceptibles de stimuler

l'expression de LXRα. En effet, des études récentes ont montré que le 27-hydroxycholestérol n'était pas le ligand préférentiel du LXRα mais est un relativement faible activateur de LXRα (Janowski et coll, 1996 ; Lehman et coll, 1997). Ainsi certains oxystérols formés lors d'étapes intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol pourraient être responsables de l'induction de l'expression de LXRα après traitement par la CsA. La régulation de LXRα serait également dépendante du site de production des oxystérols : dans des fibroblastes humains, le 27-hydroxycholestérol serait un ligand important de LXRα permettant son activation et l'induction de ABCA1 (Fu et coll, 2001).

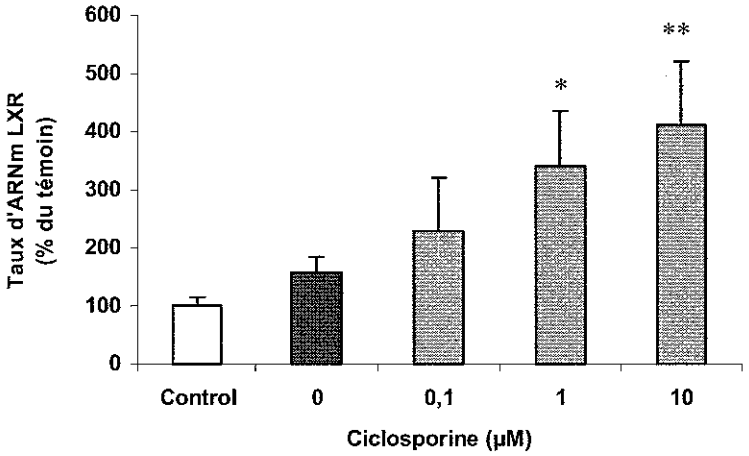


Figure 20 *: Effet de la CsA en présence de cholestérol (100µM) sur l'expression du LXRα par les cellules HepG2*
**p<0.05, **p<0.01, significativement différent du groupe témoin par le test de Student*

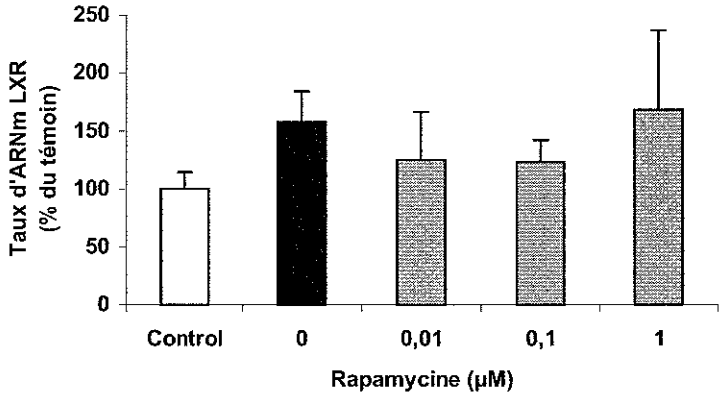


Figure 21 *: Effet de la RAPA en présence de cholestérol (100µM) sur l'expression du LXRα par les cellules HepG2.*

En conditions de fortes concentrations de cholestérol, LXRα induit la transcription de SREBP-1c (Repa et coll, 2000b), le régulateur majeur des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras conduisant à la formation de phospholipides ou de triglycérides. En effet, l'accumulation hépatique de triglycérides chez des souris ayant un régime riche en cholestérol est dépendant de l'expression de LXR (Peet et coll, 1998). D'après les travaux de Schultz et coll (2000) effectués sur des souris, plus de 20 gènes associés au métabolisme des acides gras sont induits par des agonistes de LXR. Ainsi l'induction de LXRα pourrait contribuer à l'hypertriglycéridémie observée en présence de CsA (ou RAPA) du fait de leur rôle dans l'induction de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras, composant essentiel pour la formation des triglycérides.
Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées, la RAPA ne modifie pas de façon significative l'expression de LXRα (***Figure 21***). Ce qui, soit invalide l'hypothèse précédente, soit suggère que la RAPA agisse via une autre voie d'action pour augmenter le taux de triglycérides. Notre faveur va à une autre voie d'action, notamment parce que ABCA1 n'est pas significativement affecté par les différentes doses de RAPA (***Figure 17***). Dans notre travail, nous avons montré que l'expression de LXRα et d'ABCA1 était augmentée en présence de CsA dans les cellules HepG2. En ce qui concerne la RAPA, aucune variation significative de leur expression n'est observée

Il est probable que les ligands du LXR sont formés par d'autres voies en plus de la biosynthèse des acides biliaires. En particulier, des études récentes suggèrent que des intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol servent de ligands à LXR (Lehman et coll, 1997, Lu et al, 2001). Ainsi une inhibition de la biosynthèse du cholestérol dans une lignée cellulaire hépatique de rat conduit à une répression du taux d'ARNm de SREBP-1c, un gène cible de LXRα (Repa et coll, 2000a, DeBose-Boyd et coll, 2001). Les meilleurs activateurs de LXRα seraient le 22 (R)hydroxycholestérol, le 24(S)hydroxycholestérol et le 24(S), 25-époxycholestérol qui seraient formés via une dérivation de la voie de biosynthèse du cholestérol (Spencer et coll, 1994). L'augmentation de cholestérol, ainsi que celle de l'HMGR, favoriseraient l'augmentation de la production de ces oxystérols et l'induction de LXRα qui s'ensuit.

Conclusion & Perspectives

L'hyperlipidémie est un effet secondaire commun à de nombreux traitements immunosuppresseurs dont la CsA et la RAPA qui appartiennent néanmoins à des familles différentes d'immunosuppresseurs et ont donc des mécanismes d'action distincts. Toutefois, le fait qu'ils partagent ces effets hypercholestérolémiant et hyperlipidémiant conduit au développement de pathologies cardiovasculaires qui sont la première cause de mortalité chez les patients transplantés. Si différents travaux ont rapporté les effets de la CsA sur différentes protéines impliquées dans l'homéostasie du cholestérol très peu d'études ont porté, en dehors des études cliniques, sur les mécanismes responsables de l'hyperlipidémie causée par la RAPA. Par ce travail, nous apportons quelques éléments de réponse.

La première étape de ce travail a consisté à étudier l'effet des immunosuppresseurs sur les activités enzymatiques du catabolisme du cholestérol dans la lignée cellulaire d'origine hépatique HepG2. La biosynthèse des acides biliaires étant la principale voie d'élimination du cholestérol, sa régulation joue un rôle primordial dans l'homéostasie du cholestérol. En effet, le 27-hydroxycholestérol produit par le CYP27A1 est un régulateur important de la biosynthèse du cholestérol et notamment de l'HMGR. Ainsi, nous avons observé une inhibition de l'activité CYP27A1 en présence de CsA ou de RAPA qui serait responsable d'une diminution du catabolisme du cholestérol mais aussi d'une augmentation de sa synthèse liée à l'augmentation de l'expression de l'HMGR (Publication 1). La RAPA est un inhibiteur de l'activité CYP27A1 moins puissant que la CsA. De plus, ces immunosuppreurs agissent par différents mécanismes, compétitif ou non-compétitif pour la RAPA et la CsA respectivement. Ces effets sur la dégradation du cholestérol et leurs conséquences sur la biosynthèse du cholestérol participeraient tant pour la CsA que pour la RAPA à l'hypercholestérolémie observée chez de nombreux patients. Les effets de la CsA et de la RAPA sur l'activité CYP27A1ont été complétés par l'étude des activités CYP7A1, CYP7B1 et HMGR en présence de chacun des immunosuppresseurs. L'activité CYP7B1, la seconde enzyme importante de la voie acide de la biosynthèse des acides biliaires est inhibée par la CsA alors que la RAPA ne semble pas l'affecter, ce qui va dans le sens d'une inhibition spécifique de la voie acide de la biosynthèse des acides biliaires par la CsA aboutissant à une diminution de la synthèse d'ACDC.

Cette première partie a permis de vérifier l'hypothèse que la RAPA tout comme la CsA était responsable d'une inhibition de la CYP27A1 (Princen et coll, 1991 ; Winegar et coll, 1996; Souidi et coll, 1999). De plus, l'augmentation de l'expression de l'HMGR en présence de CsA et de RAPA serait la conséquence d'une diminution du rétrocontrôle négatif par le 27-hydroxycholestérol.

Par la suite, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au transport du cholestérol et des triglycérides. Les lipoprotéines sont synthétisées essentiellement par le foie et permettent le transport de ces molécules hydrophobes. Elles sont captées par des récepteurs spécifiques dont le LDL-R et SRBI qui reconnaissent certaines apolipoprotéines à la surface de ces lipoprotéines. Ainsi l'homéostasie du cholestérol est fortement dépendante de l'expression et de l'activité de ces récepteurs et de leurs ligands. La diminution de l'expression du LDL-R (Publication 2), qui permet la capture des particules LDL riche en cholestérol, participerait de façon importante à l'augmentation du LDL-C chez les patients traités par la CsA ou la RAPA. De plus, différentes études ont précédemment établi que la CsA inhibait également la fixation, l'internalisation et la dégradation des LDL (Kaptein et coll, 1994 ; Winegar et coll, 1996 ; AlRayyes et coll, 1996). Par contre, l'expression du transporteur ABCA1 qui participe à l'efflux du cholestérol par la formation de HDL, est augmentée en présence de CsA. En ce qui concerne la RAPA, aucune variation significative de l'expression de ce transporteur n'est observée. Nous avons émis l'hypothèse qu'en présence de CsA, une augmentation intra-cellulaire de cholestérol consécutive à l'induction de l'HMGR (Publication 1), stimulerait l'expression de ABCA1 (Publication 2). D'autre part, l'expression de LXRα, un récepteur nucléaire responsable de l'activation de ABCA1, est également augmentée en présence de CsA et pourrait être responsable de l'induction de ABCA1 observée. Concernant la RAPA, aucune variation significative de l'expression de ces deux gènes n'est observée. L'altération de la sécrétion de certaines apolipoprotéines dont l'apoB et l'apoAI par la CsA (Publication 2) favoriserait également le défaut de transport de cholestérol donc l'accumulation de LDL-C. La forte diminution de la sécrétion d'apoB par les cellules HepG2 est également temps-dépendante et pourrait être due à un défaut de translocation de l'apoB à travers la membrane. La diminution de la sécrétion d'apoAI par les cellules HepG2, en présence de CsA, est en accord avec les essais cliniques réalisés par ailleurs ; elle pourrait affecter la reconnaissance des HDL par SRBI et le transport inverse du cholestérol. Concernant la RAPA, aucune variation significative n'est observée probablement du fait de la limite du modèle.

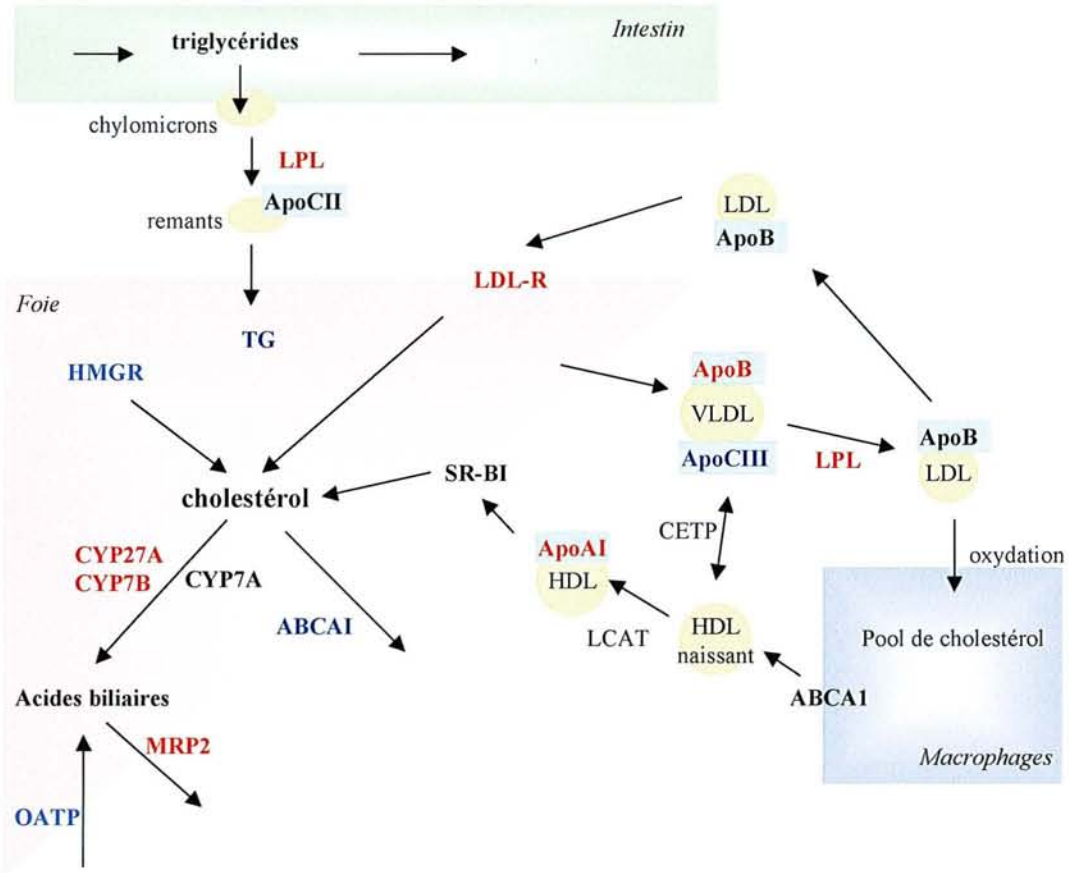


Figure 22 *: Représentation shématique des lieux d'action des immunosuppresseurs CsA et RAPA responsables d'hyperlipidémies*

Légende : En bleu : activité ou expression augmentée
En rouge : activité ou expression diminuée
ABCA1, CYP7B et l'apoAI sont uniquement affectés par la CsA

Les dyslipidémies observées après transplantation peuvent avoir 2 conséquences majeures. Elles peuvent contribuer au développement de maladies cardiovasculaires et peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse conduisant au rejet de greffe d'organes.

Une augmentation de LDL-cholestérol, qui pourrait être la conséquence d'une diminution de leur capture par le LDL-R, a été fermement établie comme un facteur de risque de maladies cardiovasculaires. Il existe de nombreux essais cliniques démontrant la contribution des dyslipidémies dans le développement des maladies liées aux greffes d'organes (Andany et Kasiske, 2001). Puisque l'hyperlipidémie la plus commune est une augmentation de LDL-cholestérol, la diminution de sa concentration est la première cible envisagée. Clairement, les statines (inhibiteurs de l'HMGR) sont les plus efficaces pour diminuer le taux de LDL-cholestérol. Les statines inhibent l'HMGR donc la synthèse de cholestérol et en

conséquence augmentent l'expression du LDL-R, surtout dans le foie, aboutissant à une diminution du cholestérol plasmatique. Nous avons montré qu'en présence de CsA ou de RAPA, l'HMGR était augmentée alors le LDL-R était diminué, les statines sont donc les médicaments appropriés pour la diminution de cette hypercholestérolémie. Toutefois, les immunosuppresseurs étant le plus souvent métabolisés par des enzymes à cytochromes P450, il est nécessaire de tenir compte des éventuelles interactions médicamenteuses avec les statines également métabolisées par des CYP. En dehors de leur effet sur la concentration lipidique, certaines statines auraient également des effets immunomodulateurs (Kobashigawa et al, 1995 ; Katzunelson, 1999). D'autres traitements sont utilisés pour diminuer l'hyperlipidémie postransplantatoire. Les fibrates induisent une diminution du taux de triglycérides et une augmentation de HDL-cholestérol. Nous avons montré que la sécrétion de certaines apolipoprotéines, notamment l'apoAI, étaient diminuée en présence d'immunosuppresseurs et pourrait expliquer la diminution du HDL-cholestérol. Les fibrates sont métabolisés par le CYP3A4 et des interactions médicamenteuses peuvent également avoir lieu avec les immunosuppresseurs et les statines (Andany et Kasiske, 2001).

Bien que les traitements immunosuppresseurs par la CsA ou la RAPA soient responsable de modifications similaires de l'expression (HMGR, LDL-R) ou de l'activité de différentes protéines (CYP27A1), ils ont également des effets différents pour d'autres protéines impliquées dans l'homéostasie du cholestérol notamment le mécanisme d'inhibition de CYP27A1, l'expression de ABCA1 et LXRα et la sécrétion d'apolipoprotéines. On peut penser que certains de ces effets secondaires expliqueraient les caractéristiques communes de l'hyperlipidémie observée en présence de CsA ou de RAPA mais que les mécanismes de développement de cet événement indésirable majeur ne sont pas totalement superposables.

En perspectives, il serait intéressant d'analyser :

- Les effets de la CsA et de la RAPA sur le métabolisme des acides biliaires *in vivo* (souris, hamster) avec le profil d'expression des enzymes impliquées ; notamment le CYP8B1, la quatrième enzyme importante de la biosynthèse des acides biliaires du fait de son rôle clé dans la détermination du type d'acide biliaire primaire synthétisé. Les effets de la CsA et de la RAPA à partir d'un autre modèle cellulaire ou de cellules HepG2 transfectées permettrait également de confirmer ces résultats. D'après les travaux de Pandak et coll (2001), la surexpression de CYP7A1 ainsi obtenue permet

d'obtenir un taux d'AC similaire à celui de l'ACDC du fait de l'augmentation de l'expression et de l'activité de CYP7A1.

- Les effets des immunosuppresseurs sur l'activité des récepteurs de lipoprotéines ; notamment le LDL-R en présence de RAPA pour vérifier si la fixation et l'internalisation des LDL sont altérées de façon similaire à la CsA. On pourrait éventuellement étendre le travail à d'autres récepteurs comme le VLDL-R qui joue un rôle primordial dans la clairance des VLDL qui sont, avec les chylomicrons, les transporteurs majeurs des triglycérides ce qui permettrait de mieux appréhender l'hypertriglycéridémie causée par la RAPA et la CsA

- L'activation des facteurs de transcription, approche plus correcte que celle de leur seule expression. Dans ce cadre, on peut élargir à d'autres facteurs de transcription tels que FXR, PPARα ou SREBPs. Le récepteur nucléaire PPARα est notamment impliqué dans le métabolisme des triglycérides et des acides gras ainsi que dans la régulation du métabolisme des acides biliaires (Hunt et coll, 2000). En effet, l'activation de PPARα est responsable d'une diminution de l'expression des CYP7A1 et CYP27A1. SREBP-1c active préférentiellement des gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras et des triglycérides alors que SREBP-2 est responsable de l'activation de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (Horton et coll, 2002). FXR est non seulement un régulateur important du métabolisme du cholestérol et des acides biliaires mais il est également associé au taux de triglycérides (Kast et coll, 2001).

- Les effets d'autres immunosuppresseurs tel que le tacrolimus, à titre de comparaison. Cet immunosuppresseur similaire à la rapamycine, est responsable de moins d'hyperlipémies. Ceci permettrait de vérifier s'il n'est pas responsable des mêmes modifications d'expression ou d'activités enzymatiques impliquées dans l'homéostasie du cholestérol. Enfin l'everolimus meriterait aussi une étude comparative.

Références bibliographiques

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 1996 ;271(5248):518-20

Acton SL, Kozarsky KF, Rigotti A The HDL receptor SR-BI: a new therapeutic target for atherosclerosis? Mol Med Today 1999;5(12):518-24

Agellon LB. Partial transfection of liver with a synthetic cholesterol 7 alpha-hydroxylase transgene is sufficient to stimulate the reduction of cholesterol in the plasma of hypercholesterolemic mice. Biochem Cell Biol 1997;75(3):255-62

Alberti S, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U, Rudling M, Angelin B, Bjorkhem I, Pettersson S, Gustafsson JA. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. J Clin Invest. 2001;107(5):565-73.

Almawi WY, Melemedjian OK. Clinical and mechanistic differences between FK506 (tacrolimus) and cyclosporin A. Nephrol Dial Transplant 2000;15(12):1916-8

Andany MA, Kasiske BL. Dyslipidemia and its management after renal transplantation J Nephrol. 2001 ; 14 :S81-S88

Anderson S, Davis DL, Dahlback H, et al. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. J Biol Chem. 1989 ; 264(14) :8222-8229

Andreou ER, Prokipcak RD. Analysis of human CYP7A1 mRNA decay in HepG2 cells by reverse transcription-polymerase chain reaction. Arch Biochem Biophys 1998 Sep 1;357(1):137-46

Axelson M, Larsson O Low density lipoprotein (LDL) cholesterol is converted to27-hydroxycholesterol in human fibroblasts. Evidence that 27-hydroxycholesterol can be an important intracellular mediator between LDL and the suppression of cholesterol production. J Biol Chem 1995;270(25):15102-10

Babiker A, Andersson O, Lund E, Xiu RJ, Deeb S, Reshef A, Leitersdorf E, Diczfalusy U, Bjorkhem I. Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. J Biol Chem. 1997;272(42):26253-61.

Ballantyne CM, Podet EJ, Patsch WP, et al. Effects of cyclosporine therapy on plasma lipoprotein levels. JAMA. 1989 ; 262(1) : 53-56

Bauchart D, Gruffat D, Graulet B, et al.. Production et stockage des triglycérides par le foie. Cah Nutr Diét ; 1997 : 32 : 233-240.

Beil FU, Grundy SM Studies on plasma lipoproteins during absorption of exogenous lecithin in man. J Lipid Res 1980 Jul;21(5):525-36

Bjorkhem I, Andersson O, Diczfalusy U, Sevastik B, Xiu RJ, Duan C, Lund E Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91(18):8592-6

Bjorkhem I, Diczfalusy U, Lutjohann D Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms. Curr Opin Lipidol 1999;10(2):161-5

Bjorkhem I, Lund E, Rudling M. Coordinate regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and HMG-CoA reductase in the liver. Subcell Biochem 1997;28:23-55

Blum CB. Effects of sirolimus on lipids in renal allograft recipients: an analysis using the Framingham risk model. Am J Transplant. 2002 ; 2(6) :551-559

Boots JM, van Duijnhoven EM, Christians MH, et al. Single-center experience with tacrolimus versus cyclosporine-Neoral in renal transplant recipients. Transpl Int 2001 ; 14(6) : 370-383

Bramow S, Ott P, Thomsen Nielsen F, Bangert K, Tygstrup N, Dalhoff K. Cholestasis and regulation of genes related to drug metabolism and biliary transport in rat liver following treatment with cyclosporine A and sirolimus (Rapamycin). Pharmacol Toxicol. 2001;89(3):133-9.

Breuer O, Bjorkhem I Simultaneous quantification of several cholesterol autoxidation and monohydroxylation products by isotope-dilution mass spectrometry. Steroids 1990 ;55(4):185-92

Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Hayden MR, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. Nat Genet 1999;22(4):336-45

Brown MS, Goldstein JL A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 1986;232(4746):34-47

Brown MS, Goldstein JL.The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell 1997;89(3):331-40

Brown MS, Goldstein JL Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. J Lipid Res 1980;21(5):505-17

Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC Jr, Abraham RT. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. Science 1997;277(5322):99-101

Cali JJ, Hsieh CL, Francke U, Russell DW Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. J Biol Chem 1991;266(12):7779-83

Cali JJ, Russell DW Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. J Biol Chem 1991;266(12):7774-8

Chapman MJ [Lipoproteins and the liver]. Gastroenterol Clin Biol 1982;6(5):482-99

Chen W, Kubota S, Kim KS, Cheng J, Kuriyama M, Eggertsen G, Bjorkhem I, Seyama Y Novel homozygous and compound heterozygous mutations of sterol27-hydroxylase gene (CYP27) cause cerebrotendinous xanthomatosis in three Japanese patients from two unrelated families. J Lipid Res 1997;38(5):870-9

Chen W, Kubota S, Teramoto T, Ishida S, Ohsawa N, Katayama T, Takeda T, Kuroda K, Yahara O, Kusuhara T, Neshige R, Seyama Y Genetic analysis enables definite and rapid diagnosis of cerebrotendinous xanthomatosis. Neurology 1998;51(3):865-7

Chen W, Kubota S, Ujike H, Ishihara T, Seyama Y A novel Arg362Ser mutation in the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27): its effects on pre-mRNA splicing and enzyme activity. Biochemistry 1998 27;37(43):15050-6

Chiang JYL. Regulation of bile acid synthesis. Front Biosci 1998 ; 3 : D176-D193.

Chiang JY, Stroup D Identification and characterization of a putative bile acid-responsive element in cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene promoter. J Biol Chem 1994 1;269(26):17502-7

Chin DJ, Gil G, Faust JR, Goldstein JL, Brown MS, Luskey KL Sterols accelerate degradation of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase encoded by a constitutively expressed cDNA. Mol Cell Biol 1985;5(4):634-41

Choi JW, Peffley DM3'-untranslated sequences mediate post-transcriptional regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA by 25-hydroxycholesterol. Biochem J 1995;307 (Pt 1):233-8

Christians U, Sewing KF. Alternative cyclosporine metabolic pathways and toxicity. Clin Biochem 1995;28(6):547-59

Clarke CF, Fogelman AM, Edwards PA Transcriptional regulation of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene in rat liver. J Biol Chem 1985 15;260(26):14363-7

Claudel T, Sturm E, Duez H, et al. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. J Clin Invest. 2002 ; 109(7) : 961-971

Cohen JC, Cali JJ, Jelinek DF, Mehrabian M, Sparkes RS, Lusis AJ, Russell DW, Hobbs HH Cloning of the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene (CYP7) and localization to chromosome 8q11-q12. Genomics 1992 ;14(1):153-61

Combettes-Souverain M, Milliat F, Sérougne C, Serougne C, Férézou J, Lutton C. SR-BI et métabolisme du cholestérol. Médecine / Sciences 1999, 15(11) : 1252-1258.

Cooper AD, Chen J, Botelho-Yetkinler MJ, Cao Y, Taniguchi T, Levy-Wilson B. Characterization of hepatic-specific regulatory elements in the promoter region of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene. J Biol Chem 1997;272(6):3444-52

Couture P, Otvos JD, Cupples LA, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM Association of the A-204C polymorphism in the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene with variations in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in the Framingham Offspring Study. J Lipid Res 1999;40(10):1883-9

Crestani M, Sadeghpour A, Stroup D, Galli G, Chiang JY. The opposing effects of retinoic acid and phorbol esters converge to a common response element in the promoter of the rat cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene (CYP7A). Biochem Biophys Res Commun 1996;225(2):585-92

Crestani M, Sadeghpour A, Stroup D, Galli G, Chiang JY Transcriptional activation of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors. J Lipid Res 1998;39(11):2192-200

Crisby M, Nilsson J, Kostulas V, Bjorkhem I, Diczfalusy U Localization of sterol 27-hydroxylase immuno-reactivity in human atherosclerotic plaques. Biochim Biophys Acta 1997;1344(3):278-85

Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR.Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. J Biol Chem 2000;275(36):28240-5

Dahlback-Sjoberg, H., Bjorkhem, I. and Princen, H.M., 1993, Selective inhibition of mitochondrial 27-hydroxylation of bile acid intermediates and 25-hydroxylation of vitamin D3 by cyclosporine A. Biochemical Journal, **293,** 203-206.

Deters M, Klabunde T, Kirchner G, et al. Sirolimus/cyclosporine/tacrolimus interactions on bile flow and biliary excretion of immunosuppressants in a subchronic bile fistula rat model. Br J Pharmacol. 2002 ; 136(4) : 604-12

Deters, M., Nolte, K., Kirchner, et al. Comparative study analyzing effects of sirolimus-cyclosporine and sirolimus-tacrolimus combinations on bile flow in the rat. Dig Dis Sci 2001 ; 40 : 2120-2126

Di Croce L, Vicent GP, Pecci A, Bruscalupi G, Trentalance A, Beato M The promoter of the rat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene contains a tissue-specific estrogen-responsive region. Mol Endocrinol 1999;13(8):1225-36

Diczfalusy, U., Lund, E., Lutjohann, D. and Bjorkhem, I. Novel pathways for elimination of cholesterol by extrahepatic formation of side-chain oxidized oxysterols. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1996 ; 226 : 9-17.

Dotzlaw H, Leygue E, Watson P, Murphy LC.The human orphan receptor PXR messenger RNA is expressed in both normal and neoplastic breast tissue. Clin Cancer Res 1999 Aug;5(8):2103-7

Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. Anal Biochem 1995 10;225(1):73-80.

Edwards PA, Kast HR, Anisfeld AM. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. J Lipid Res. 2002;43(1):2-12. Review.

Eisenberg S Plasma lipoprotein conversions: the origins of low-density and high-density lipoproteins. Ann N Y Acad Sci 1980;348:30-47

Emmel EA, Verweij CL, Durand DB, Higgins KM, Lacy E, Crabtree GR. Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. Science 1989;246(4937):1617-20

Erickson SK, Fielding PE Parameters of cholesterol metabolism in the human hepatoma cell line, Hep-G2.. J Lipid Res 1986;27(8):875-83

Erlinger S [How is a cholesterol gallstone formed]? Gastroenterol Clin Biol 1994;18(11):984-7

Esser V, Russell DW Transport-deficient mutations in the low density lipoprotein receptor. Alterations in the cysteine-rich and cysteine-poor regions of the protein block intracellular transport. J Biol Chem 1988 15;263(26):13276-81

Esterman AL, Baum H, Javitt NB, Darlington GJ26-hydroxycholesterol: regulation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase activity in Chinese hamster ovary cell culture. J Lipid Res 1983;24(10):1304-9

Everson GT, Polokoff MA. HepG2. A human hepatoblastoma cell line exhibiting defects in bile acid synthesis and conjugation. J Biol Chem. 1986 15;261(5):2197-201.

Faust JR, Luskey KL, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS Regulation of synthesis and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase by low density lipoprotein and 25-hydroxycholesterol in UT-1 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1982;79(17):5205-9

Fojo SS, Brewer HB. Hypertriglyceridaemia due to genetic defects in lipoprotein lipase and apolipoproteinC-II. J Intern Med. 1992 Jun;231(6):669-77. Review.

Francone OL, Haghpassand M, Bennett JA, Royer L, McNeish J.Expression of human lecithin:cholesterol acyltransferase in transgenic mice: effects on cholesterol efflux, esterification, and transport. J Lipid Res 1997;38(4):813-22

Frey, F.J., Horber, F.F. and Frey, B.M., 1988, Trough levels and concentration time curves of cyclosporine in patients undergoing renal transplantation. Clininical Pharmacology & Therapeutics, **43,** 55-62.

Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. Cell. 1995;81(5):687-93.

Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, Lund EG. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. J Biol Chem. 2001;276(42):38378-87.

Garuti R, Lelli N, Barozzini M, Tiozzo R, Dotti MT, Federico A, Ottomano AM, Croce A, Bertolini S, Calandra S Cerebrotendinous xanthomatosis caused by two new mutations of the sterol-27-hydroxylase gene that disrupt mRNA splicing. J Lipid Res 1996;37(7):1459-67

Ghiselli G, Gregg RE, Zech LA, et al. Phenotype study of apolipoprotein E isoforms in hyperlipoproteinaemic patients. Lancet. 1982 ; 2(8295) : 405-7

Goldstein JL, Brown MS. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. J Lipid Res 1984;25(13):1450-61

Goldstein JL, Brown MS Regulation of the mevalonate pathway. Nature 1990;343(6257):425-30

Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis.Arch Biochem Biophys. 2002 ;397(2):139-48. Review.

Gonzalez-Amieva A, Lopez-Miranda J, Fuentes F, Castro P, Marin C, Lopez-Granados A, Valles F, Perez Jimenez F. Genetic variations of the apolipoprotein E gene determine the plasma triglyceride levels after heart transplantation. J Heart Lung Transplant 2000;19(8):765-70

Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. Mol Cell. 2000;6(3):517-26.

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA.High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. Circulation 1989;79(1):8-15

Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA, Willson TM, Ono T, Besnard P. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. J Biol Chem. 1999;274(42):29749-54.

Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. Science. 1984;226(4674):544-7.

Hall E, Hylemon P, Vlahcevic Z, Mallonee D, Valerie K, Avadhani N, Pandak W. Overexpression of CYP27 in hepatic and extrahepatic cells: role in the regulation of cholesterol homeostasis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001;281(1):G293-301.

Halloran PF. Sirolimus and cyclosporin for renal transplantation. Lancet 2000 Jul 15;356(9225):179-80

Haria M, McTavish D Pravastatin. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical effectiveness in the management of coronary heart disease. Drugs 1997;53(2):299-336

Hassan AS, Bunick D, Lund LA, Bottje WG. Glutathione and bile acid synthesis. Effect of GSH content of HepG2 cells on the activity and mRNA levels of cholesterol 7 alpha-hydroxylase. Biochem Pharmacol. 1992;44(7):1475-7.

Hiltunen TP, Yla-Herttuala S Expression of lipoprotein receptors in atherosclerotic lesions. Atherosclerosis 1998;137 Suppl:S81-8

Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein J The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. Annu Rev Genet 1990;24:133-70

Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. News Physiol Sci. 1999 ;14:24-29.

Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Pownall HJ, et al. Effect of sirolimus on the metabolism of apoB100- containing lipoproteins in renal transplant patients. Transplantation 2001 ; 72(7) : 1244-50

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest. 2002 May;109(9):1125-31. Review. No abstract available.

Hunt MC, Yang YZ, Eggertsen G, Carneheim CM, Gafvels M, Einarsson C, Alexson SE. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) regulates bile acid biosynthesis. J Biol Chem. 2000;275(37):28947-53.

Ichimaru N, Takahara S, Kokado Y, Wang JD, Hatori M, Kameoka H, Inoue T, Okuyama A. Changes in lipid metabolism and effect of simvastatin in renal transplant recipients induced by cyclosporine or tacrolimus. Atherosclerosis 2001;158(2):417-23

Ishibashi S, Schwarz M, Frykman PK, Herz J, Russell DW. Disruption of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. J Biol Chem 1996;271(30):18017-23

Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, et al. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. Science. 1990 ; 249(4970) : 790-793

Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. Nature 1992;356(6372):801-4

Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(1):266-71.

Javitt, N.B., 1994, Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways. FASEB Journal, **8**, 1308-1311.

Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. J Biol Chem. 1997;272(34):20982-5.

Johnson WJ, Mahlberg FH, Rothblat GH, Phillips MC Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. Biochim Biophys Acta 1991;1085(3):273-98

Kaptein A, de Wit EC, Princen HM.Cotranslational inhibition of apoB-100 synthesis by cyclosporin A in the human hepatoma cell line HepG2. Arterioscler Thromb 1994;14(5):780-9

Kahan BD, Podbielski J, Napoli KL, Katz SM, Meier-Kriesche HU, Van Buren CT. Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. Transplantation 1998;66(8):1040-6

Kandutsch AA, Chen HW, Heiniger HJ.Biological activity of some oxygenated sterols. Science 1978;201(4355):498-501

Karam WG, Chiang JY Polymorphisms of human cholesterol 7 alpha-hydroxylase. Biochem Biophys Res Commun 1992;185(2):588-95

Kasiske BL, Tortorice KL, Heim-Duthoy KL, et al. The adverse impact of cyclosporine on serum lipids in renal transplant recipients. Am J Kidney Dis. 1991 ; 17(6) : 700-707

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. J Biol Chem. 2002 ; 277(4) : 2908-2915

Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, et al. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. Mol Endocrinol 2001 ; 15(10) : 1720-1728

Keogh A, Macdonald P, Kaan A, Aboyoun C, Spratt P, Mundy J. Efficacy and safety of pravastatin vs simvastatin after cardiac transplantation. J Heart Lung Transplant 2000;19(6):529-37

Kim KS, Kubota S, Kuriyama M, Fujiyama J, Bjorkhem I, Eggertsen G, Seyama Y Identification of new mutations in sterol 27-hydroxylase gene in Japanese patients with cerebrotendinous xanthomatosis (CTX). J Lipid Res 1994;35(6):1031-9

Kovarik JM, Kaplan B, Tedesco Silva H, et al. Exposure-response relationships for everolimus in de novo kidney transplantation: defining a therapeutic range. Transplantation. 2002 ; 73(6) : 920-925

Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, et al. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. Nature. 1997 ; 387(6631) : 414-417

Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. Nat Med 2000;6(12):1399-402

Kwiterovich PO Jr.The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. Am J Cardiol 2000 21;86(12A):5L-10L

Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter

1(hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. Biochem Biophys Res Commun 1999;257(1):29-33

Lampen A, Zhang Y, Hackbarth I, Benet LZ, Sewing KF, Christians U.Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine. J Pharmacol Exp Ther 1998;285(3):1104-12

Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. J Clin Invest 1999;104(8):R25-31

Lee C, Martin KO, Javitt NB. Bile acid synthesis: 7 alpha-hydroxylation of intermediates in the sterol 27-hydroxylase metabolic pathway. J Lipid Res 1996;37(6):1356-62

Lee YH, Alberta JA, Gonzalez FJ, Waxman DJ Multiple, functional DBP sites on the promoter of the cholesterol 7 alpha-hydroxylase P450 gene, CYP7. Proposed role in diurnal regulation of liver gene expression. J Biol Chem 1994;269(20):14681-9

Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. J Biol Chem 1997;272(6):3137-40

Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. J Clin Invest. 1998;102(5):1016-23.

Leitersdorf E, Reshef A, Meiner V, Levitzki R, Schwartz SP, Dann EJ, Berkman N, Cali JJ, Klapholz L, Berginer VM Frameshift and splice-junction mutations in the sterol 27-hydroxylase gene cause cerebrotendinous xanthomatosis in Jews or Moroccan origin. J Clin Invest 1993;91(6):2488-96

Leitersdorf E, Safadi R, Meiner V, Reshef A, Bjorkhem I, Friedlander Y, Morkos S, Berginer VM Cerebrotendinous xanthomatosis in the Israeli Druze: molecular genetics and phenotypic characteristics. Am J Hum Genet 1994;55(5):907-15

Levine GN, Keaney JF Jr, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. N Engl J Med. 1995 Feb 23;332(8):512-21.

Levy J, Budai K, Javitt NB. Bile acid synthesis in HepG2 cells: effect of cyclosporin. J Lipid Res. 1994;35(10):1795-800.

Li-Hawkins J, Lund EG, Turley SD, Russell DW. Disruption of the oxysterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. J Biol Chem 2000;275(22):16536-42

Liscum L, Cummings RD, Anderson RG, DeMartino GN, Goldstein JL, Brown MS3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase: a transmembrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum with N-linked "high-mannose" oligosaccharides. Proc Natl Acad Sci U S A 1983;80(23):7165-9

Liscum L, Munn NJ Intracellular cholesterol transport. Biochim Biophys Acta 1999;1438(1):19-37

Lloyd DB, Thompson JF Transcriptional modulators affect *in vivo* protein binding to the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoters. J Biol Chem 1995;270(43):25812-8.

Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. Mol Cell. 2000 Sep;6(3):507-15.

Lund E, Bjorkhem I. Down-regulation of hepatic HMG-CoA reductase in mice by dietary cholesterol: importance of the delta 5 double bond and evidence that oxidation at C-3, C-5, C-6, or C-7 is not involved. Biochemistry 1994;33(1):291-7

Luo Y, Tall AR. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. J Clin Invest. 2000;105(4):513-20.

Luoma J, Hiltunen T, Sarkioja T, Moestrup SK, Gliemann J, Kodama T, Nikkari T, Yla-Herttuala S Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest 1994;93(5):2014-21

Lloyd DB, Thompson JF Transcriptional modulators affect *in vivo* protein binding to the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoters. J Biol Chem 1995;270(43):25812-8.

MacDonald, A., Scarola, J., Burke, J.T. and Zimmerman, J.J., 2000, Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. Clinical Therapeutics, 22, B101-121.

Macri J, Adeli K.Studies on intracellular translocation of apolipoprotein B in a permeabilized HepG2 system. J Biol Chem 1997 14;272(11):7328-37

Mahley RW, Innerarity TL, Bersot TP, Lipson A, Margolis S Alterations in human high-density lipoproteins, with or without increased plasma-cholesterol, induced by diets high in cholesterol. Lancet 1978;2(8094):807-9

Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B Identification of a nuclear receptor for bile acids. Science 1999;284(5418):1362-5

Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, et al. Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. J Med Chem. 2000 ; 43(16) : 2971-4

Marrapodi M, Chiang JY. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and agonist inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. J Lipid Res. 2000;41(4):514-20.

Martin KO, Reiss AB, Lathe R, Javitt NB. 7 alpha-hydroxylation of 27-hydroxycholesterol: biologic role in the regulation of cholesterol synthesis. J Lipid Res 1997;38(5):1053-8

Martin KO, Budai K, Javitt NB. Cholesterol and 27-hydroxycholesterol 7 alpha-hydroxylation: evidence for two different enzymes. J Lipid Res 1993;34(4):581-8

Mathe D, Lutton C [Cholesterol. Dynamic and metabolic aspects]. J Physiol (Paris) 1984;79(2):41-97

McAlister VC, Gao Z, Peltekian K, et al. Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression. Lancet. 2000 ; 355(9201) : 376-377

McCune TR, Thacker LR II, Peters TG, et al. Effects of tacrolimus on hyperlipidemia after successful renal transplantation: a Southeastern Organ Procurement Foundation multicenter clinical study. Transplantation. 1998 ; 65(1) : 87-92

McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(8):4245-50

Mizuta K, Kobayashi E, Uchida H, Ogino Y, Fujimura A, Kawarasaki H, Hashizume K. Cyclosporine inhibits transport of bile acid in rats: comparison of bile acid composition between liver and bile. Transplant Proc. 1999 ; 31(7) : 2755-2756

Morelon E, Mamzer-Bruneel MF, Peraldi MN, Kreis H. Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation. Nephrol Dial Transplant 2001;16(1):18-20

Morris RE. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. Ther Drug Monit 1995;17(6):564-9

Morrisett JD, Abdel-Fattah G, Hoogeveen R, Mitchell E, Ballantyne CM, Pownall HJ, Opekun AR, Jaffe JS, Oppermann S, Kahan BD. Effects of sirolimus on plasma lipids, lipoprotein levels, and fatty acid metabolism in renal transplant patients. J Lipid Res. 2002;43(8):1170-80.

Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, Quehenberger O. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. J Biol Chem 1997 Jul 11;272(28):17551-7

Myant NB Cholesterol transport through the plasma. Clin Sci (Colch) 1982 Mar;62(3):261-71

Napoli, K.L., Wang, M.E., Stepkowski, S.M., Kahan, B.D., 1997, Distribution of sirolimus in rat tissue. Clinical Biochemistry, 30, 135-42.

Nakashima N, Sakai Y, Sakai H, Yanase T, Haji M, Umeda F, Koga S, Hoshita T, Nawata H A point mutation in the bile acid biosynthetic enzyme sterol27-hydroxylase in a family with cerebrotendinous xanthomatosis. J Lipid Res 1994;35(4):663-8

Nakanishi M, Goldstein JL, Brown MS Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Mevalonate-derived product inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme. J Biol Chem 1988;263(18):8929-37

Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P. Multiple parameters determine the specificity of transcriptional response by nuclear receptors HNF-4, ARP-1, PPAR, RAR and RXR through common response elements. Nucleic Acids Res 1998;26(10):2491-9

Ness GC, McCreery MJ, Sample CE, Smith M, Pendleton LC. Sulfhydryl/disulfide forms of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. J Biol Chem 1985;260(30):16395-9

Neufeld EB, Demosky SJ Jr, Stonik JA, Combs C, Remaley AT, Duverger N, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr.The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun 2002;297(4):974-9

Nimpf J, Schneider WJ. From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. Biochim Biophys Acta 2000;1529(1-3):287-98

Omkumar RV, Ramasarma T. Irreversible inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by H2O2. Biochim Biophys Acta 1993;1156(3):267-74

Oram JF, Mendez AJ, Slotte JP, Johnson TF High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts. Arterioscler Thromb 1991;11(2):403-14

Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS5' end of HMG CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription. Cell 1985;42(1):203-12

Pandak WM, Stravitz RT, Lucas V, Heuman DM, Chiang JY. Hep G2 cells: a model for studies on regulation of human cholesterol7alpha-hydroxylase at the molecular level. Am J Physiol 1996;270(3 Pt 1):G401-10

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. Science. 1999;284(5418):1365-8.

Paul LC. Adverse effects of immunosuppressive drugs on long-term graft outcome. Transplant Proc. 1998;30(8):4001-4.

Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. Curr Opin Genet Dev. 1998 Oct;8(5):571-5. Review.

Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. Cell. 1998 29;93(5):693-70

Post SM, Duez H, Gervois PP, Staels B, Kuipers F, Princen HM. Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21(11):1840-5.

Princen HM, Meijer P, Wolthers BG, Vonk RJ, Kuipers F Cyclosporin A blocks bile acid synthesis in cultured hepatocytes by specific inhibition of chenodeoxycholic acid synthesis. Biochem J 1991;275 (Pt 2):501-5

Princen HMG, Post SM, Twisk Y. Regulation of bile acid biosynthesis. Current Pharmac. Design 1997,3,59-84.

Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, Verhagen A, Rivera CR, Mulvihill SJ, Malloy MJ, Kane JP. Human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. J Clin Invest. 2002;110(1):109-17.

Rayyes OA, Wallmark A, Floren CH. Cyclosporine inhibits catabolism of low-density lipoproteins in HepG2 cells by about 25%. Hepatology. 1996;24(3):613-9.

Reichel C, Gao B, Van Montfoort J, Cattori V, Rahner C, Hagenbuch B, Stieger B, Kamisako T, Meier PJ.Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide Oatp2 in rat liver. Gastroenterology 1999;117(3):688-95

Reiss AB, Martin KO, Rojer DE, Iyer S, Grossi EA, Galloway AC, Javitt NB Sterol 27-hydroxylase: expression in human arterial endothelium. J Lipid Res 1997;38(6):1254-60

Rennert H, Fischer RT, Alvarez JG, Trzaskos JM, Strauss JF 3rd. Generation of regulatory oxysterols: 26-hydroxylation of cholesterol by ovarian mitochondria. Endocrinology. 1990 ; 127(2) : 738-746.

Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding

protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev. 2000 ;14(22):2819-30.

Repa JJ, Lund EG, Horton JD, Leitersdorf E, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in hepatomegaly and hypertriglyceridemia. REVERSAL BY CHOLIC ACID FEEDING J Biol Chem 2000;275(50):39685-92

Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. Curr Opin Biotechnol 1999;10(6):557-63

Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. Science. 2000;289(5484):1524-9.

Reshef A, Meiner V, Berginer VM, Leitersdorf E Molecular genetics of cerebrotendinous xanthomatosis in Jews of north African origin. J Lipid Res 1994;35(3):478-83

Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(23):12610-5

Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. J Lipid Res 1999;40(5):781-96

Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, et al. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. Nature 1991 ; 353(6341) : 265-7

Rudling M, Angelin B, Stahle L, Reihner E, Sahlin S, Olivecrona H, Bjorkhem I, Einarsson C. Regulation of hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and cholesterol 7alpha-hydroxylase mRNAs in human liver. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(9):4307-13

Rudling M. Hepatic mRNA levels for the LDL receptor and HMG-CoA reductase show coordinate regulation *in vivo*. J Lipid Res 1992 ;33(4):493-501

Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denefle P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. Nat Genet 1999;22(4):352-5

Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. N Engl J Med 1996 3;335(14):1001-9

Salen G, Berginer V, Shore V, Horak I, Horak E, Tint GS, Shefer S. Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. Effect of chenodeoxycholic acid. N Engl J Med 1987;316(20):1233-8

Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. Drug Metab Dispos 1992;20(5):753-61

Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. Kidney Int 2001;59(1):3-16

Schmittgen TD, Zakrajsek BA.Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. : J Biochem Biophys Methods 2000 Nov 20;46(1-2):69-81

Schultz JR, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis.Genes Dev. 2000 ; 14(22) : 2831-2838

Schwarz M, Lund EG, Russell DW. Two 7 alpha-hydroxylase enzymes in bile acid biosynthesis. Curr Opin Lipidol 1998;9(2):113-8

Schwarz M, Lund EG, Setchell KD, Kayden HJ, Zerwekh JE, Bjorkhem I, Herz J, Russell DW Disruption of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7alpha-hydroxylase. J Biol Chem 1996;271(30):18024-31

Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol7alpha-hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. J Lipid Res 1998;39(9):1833-43

Schwartz K, Lawn RM, Wade DP.ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. Biochem Biophys Res Commun 2000;274(3):794-802

Setchell KD, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, Thompson HR, Weslie Tyson R, Sokol RJ, Russell DW. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7alpha-hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. J Clin Invest 1998;102(9):1690-703

Sehgal SN, Camardo JS, Scarola JA, Maida BT. Rapamycin (sirolimus, rapamune). Curr Opin Nephrol Hypertens 1995 Nov;4(6):482-7

Segarra A, Chacon P, Martin M, Piera LL.Serum apolipoprotein profile of renal-transplant patients. Nephron 1995;70(2):264

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. N Engl J Med 1995;333(20):1301-7

Shiga K, Fukuyama R, Kimura S, Nakajima K, Fushiki S Mutation of the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) results in truncation of mRNA expressed in leucocytes in a Japanese family with cerebrotendinous xanthomatosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999;67(5):675-7

Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. J Clin Invest 1996;98(7):1575-84

Shoda J, He BF, Tanaka N, Matsuzaki Y, Osuga T, Yamamori S, Miyazaki H, Sjovall J. Increase of deoxycholate in supersaturated bile of patients with cholesterol gallstone disease and its correlation with de novo syntheses of cholesterol and bile acids in liver, gallbladder emptying, and small intestinal transit. Hepatology 1995 May;21(5):1291-302

Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, et al. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. Cell. 2000 ; 102(6) : 731-744

Souidi M, Parquet M, Dubrac S, Audas O, Becue T, Lutton C. Assay of microsomal oxysterol 7alpha-hydroxylase activity in the hamster liver by a sensitive method: in vitro modulation by oxysterols. Biochim Biophys Acta. 2000;1487(1):74-81.

Souidi M, Parquet M, Dubrac S, Lutton C. [New bile acid biosynthesis pathways] Gastroenterol Clin Biol. 2001;25(1):81-92. Review.

Souidi, M., Parquet, M., Ferezou, J. and Lutton, C., 1999, Modulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. Life Science, 64, 1585-1593.

Spady DK, Horton JD, Cuthbert JA. Regulatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic LDL uptake in the hamster and rat. J Lipid Res 1995;36(5):1009-20

Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH, Kliewer SA. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(6):3369-74.

Stravitz RT, Vlahcevic ZR, Russell TL, Heizer ML, Avadhani NG, Hylemon PB. Regulation of sterol 27-hydroxylase and an alternative pathway of bile acid biosynthesis in primary cultures of rat hepatocytes. J Steroid Biochem Mol Biol. 1996;57(5-6):337-47.

Stromstedt M, Rozman D, Waterman MR.The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 alpha-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. Arch Biochem Biophys 1996 1;329(1):73-81

Stroup D, Crestani M, Chiang JY Identification of a bile acid response element in the cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene CYP7A. Am J Physiol 1997 Aug;273(2 Pt 1):G508-17

Stroup D, Chiang JY HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1). J Lipid Res 2000;41(1):1-11

Takahashi Y, Smith JD. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(20):11358-63

Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. J Clin Invest 1990;86(2):379-84

Tall AR, Costet P, Wang N.Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. J Clin Invest 2002;110(7):899-904

Tamasawa N, Hayakari M, Murakami H, Matsui J, Suda T. Reduction of oxysterol levels up-regulates HMG-CoA reductase activity in rat liver. Atherosclerosis. 1997;131(2):237-42.

Taylor FR, Saucier SE, Shown EP, Parish EJ, Kandutsch AA.Correlation between oxysterol binding to a cytosolic binding protein and potency in the repression of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. J Biol Chem 1984;259(20):12382-7

Thompson JF, Lira ME, Lloyd DB, Hayes LS, Williams S, Elsenboss L Cholesterol 7 alpha hydroxylase promoter separated from cyclophilin pseudogene by Alu sequence. Biochim Biophys Acta 1993;1168(2):239-42

Tur MD, Garrigue V, Vela C, Dupuy AM, Descomps B, Cristol JP, Mourad G. Apolipoprotein CIII is upregulated by anticalcineurins and rapamycin: implications in transplantation-induced dyslipidemia. Transplant Proc. 2000;32(8):2783-4.

Twisk J, de Wit EC, Princen HM. Suppression of sterol 27-hydroxylase mRNA and transcriptional activity by bile acids in cultured rat hepatocytes. Biochem J 1995;305 (Pt 2):505-11

Vallett SM, Sanchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TF. A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. J Biol Chem 1996;271(21):12247-53

Vaziri ND, Liang K, Azad H. Effect of cyclosporine on HMG-CoA reductase, cholesterol 7alpha-hydroxylase, LDL receptor, HDL receptor, VLDL receptor, and lipoprotein lipase expressions. J Pharmacol Exp Ther. 2000;294(2):778-83.

Verrips A, Steenbergen-Spanjers GC, Luyten JA, van den Heuvel LP, Keyser A, Gabreels FJ, Wevers RA Two new mutations in the sterol 27-hydroxylase gene in two families lead to cerebrotendinous xanthomatosis. Hum Genet 1996;98(6):735-7

Vlahcevic ZR Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by different effectors. Ital J Gastroenterol 1996 ;28(6):337-9

Vlahcevic, ZR, Stravitz, RT, Heuman, DM, et al. Quantitative estimations of the contribution of different bile acid pathways to total bile acid synthesis in the rat. Gastroenterology 1997 ; 113 : 1949-1957

von Ahsen N, Helmhold M, Schutz E, Eisenhauer T, Armstrong VW, Oellerich M. Cyclosporin A trough levels correlate with serum lipoproteins and apolipoproteins: implications for therapeutic drug monitoring of cyclosporin A. Ther Drug Monit 1997;19(2):140-5

Wakamatsu N, Hayashi M, Kawai H, Kondo H, Gotoda Y, Nishida Y, Kondo R, Tsuji S, Matsumoto T Mutations producing premature termination of translation and an amino acid substitution in the sterol 27-hydroxylase gene cause cerebrotendinous xanthomatosis associated with parkinsonism. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999;67(2):195-8

Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. Mol Cell. 1999;3(5):543-53.

Wang J, Freeman DJ, Grundy SM, Levine DM, Guerra R, Cohen JC Linkage between cholesterol 7alpha-hydroxylase and high plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. J Clin Invest 1998;101(6):1283-91

Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. J Biol Chem 2001;276(26):23742-7

Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR.Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. J Biol Chem 2000;275(42):33053-8

Wang DP, Stroup D, Marrapodi M, Crestani M, Galli G, Chiang JY Transcriptional regulation of the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene (CYP7A) in HepG2 cells. J Lipid Res 1996;37(9):1831-41

Wasan KM, Donnachie EM, Seccombe DW, Pritchard PH Effect of cyclosporine A on the binding affinity and internalization of low-density lipoproteins in human skin fibroblasts. J Pharm Sci 2002;91(12):2520-4

Webb NR, Connell PM, Graf GA, Smart EJ, de Villiers WJ, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. J Biol Chem 1998;273(24):15241-8

Webb NR, de Villiers WJ, Connell PM, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). J Lipid Res 1997;38(7):1490-5

Willson TM, Jones SA, Moore JT, Kliewer SA. Chemical genomics: functional analysis of orphan nuclear receptors in the regulation of bile acid metabolism. Med Res Rev 2001;21(6):513-22

Winegar, D.A., Salisbury, J.A., Sundseth, S.S. and Hawke, R.L., 1996, Effects of cyclosporine on cholesterol 27- hydroxylation and LDL receptor activity in HepG2 cells. Journal of Lipid Research, 37, 179-191.

Wu Z, Martin KO, Javitt NB, Chiang JY. Structure and functions of human oxysterol 7alpha-hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1. J Lipid Res 1999;40(12):2195-203

Wu J, Zhu YH, Patel SB. Cyclosporin-induced dyslipoproteinemia is associated with selective activation of SREBP-2. Am J Physiol 1999;277(6 Pt 1):E1087-94

Xie W, Radominska-Pandya A, Shi Y, Simon CM, Nelson MC, Ong ES, Waxman DJ, Evans RM. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98(6):3375-80

Xu N, Ekstrom U, Nilsson-Ehle P.ACTH decreases the expression and secretion of apolipoprotein B in HepG2 cell cultures. J Biol Chem 2001 Oct 19;276(42):38680-4

Yokoyama S Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. Biochim Biophys Acta 1998;1393(1):222

Young SG, Fielding CJ. The ABCs of cholesterol efflux. Nat Genet 1999;22(4):316-8

Zhang J, Dricu A, Sjovall J Studies on the relationships between 7 alpha-hydroxylation and the ability of 25- and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase.. Biochim Biophys Acta 1997;1344(3):241-9

Autres Publications

PUBLICATION N°3

Control of apolipoprotein E secretion by 25-hydroxycholesterol and proinflammatory cytokines in the human astrocytoma cell line CCF-STTG1

GUEGUEN Y, BERTRAND P., FERRARI L, BATT A-M, AND SIEST G

Cell Biol Toxicol (2001)

Cell Biology and Toxicology, 2001; **17**: 191–199.
© 2001 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands*

Control of apolipoprotein E secretion by 25-hydroxycholesterol and proinflammatory cytokines in the human astrocytoma cell line CCF-STTG1

Y. Gueguen, P. Bertrand, L. Ferrari, A.-M. Batt and G. Siest
INSERM U525 (Equipe 4), Centre du Médicament, Université Henri Poincaré, Nancy, France

Received 27 March 2001; accepted 12 July 2001

Keywords: apolipoprotein E, Alzheimer's disease, astrocyte, cytokines, cholesterol, inflammation

Abstract

During the last few years the increased presence of proinflammatory cytokines and oxidation products in Alzheimer's disease (AD) has been largely described. Oxysterols, formed by hydroxylation of cholesterol, occur naturally in the brain and are increased in the serum of AD patients. Of these oxysterols, 25-hydroxycholesterol is the most potent regulator of gene transcription. It stimulates the synthesis of apolipoprotein E (apo E) in macrophages. Apo E plays a major role in the brain as a phospholipid and cholesterol carrier molecule in compensatory synaptogenesis. Cytokines might also be able to modulate apo E expression. Accordingly, this study examined the control of apo E secretion by several proinflammatory cytokines and oxysterols in the human astrocytoma cell line CCF-STTG1. A time-dependent stimulation of apo E secretion by 25-hydroxycholesterol was observed. Among several cytokines tested, only tumor necrosis factor (TNF)-α inhibited apo E secretion in basal conditions in CCF-STTG1 human astrocytoma cells. In the presence of 25-hydroxycholesterol, TNF-α reduced apo E secretion by 80%, while interleukins (IL) IL-1β, IL-6, and IL-2 had no significant effects. In Alzheimer's disease, the increase in the concentrations of cytokines and the concomitant decrease of cholesterol concentration in the brain could contribute jointly to reduce apo E concentration, and in doing so accelerate neurodegeneration. Surprisingly, oxysterols would be able to limit this phenomenon.

Abbreviations: apo, apolipoprotein; Aβ, amyloid β peptide; AD, Alzheimer's disease; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; IFN, interferon; IL, interleukin; LDH, lactate dehydrogenase; PVDF, poly(vinyl difluoride); TNF, tumor necrosis factor

Introduction

Inflammation and oxidation are implicated in Alzheimer's disease (AD). Both the presence of many inflammatory proteins and proinflammatory cytokines (Eikelenboom et al., 1998), and an increase in oxidative stress markers (Mattson et al., 1999) were observed in the brains of patients. Polymorphisms in proinflammatory cytokines genes are known to be risk factors for AD; several examples have accumulated recently for IL-1, IL-6, and TNF-α (Bhojak et al., 2000; Du et al., 2000; Tarkowski et al., 2000). Cytokines such as IL-1β were also implicated in pathological brain aging (Murray et al., 1998), while leading to

(accelerated) oxidative stress (Sen and Packer, 1996). The interrelation between increased production of proinflammatory cytokines and increased formation of oxidation products in neurodegenerative diseases led to studies of these parameters in astrocyte metabolism (Floyd, 1999). Moreover amyloid β peptide (Aβ), the principal constituent of senile plaques, is also involved in the generation of reactive oxygen species (Mark et al., 1996).

Several oxysterols formed by the hydroxylation of cholesterol occur naturally in the brain, including 25-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol, and 24-hydroxycholesterol. 24-Hydroxycholesterol is increased in the serum of AD patients and might represent a specific brain pathway of cholesterol degradation and efflux toward the blood (Lütjohann et al., 2000). 25-Hydroxycholesterol is the second most important oxysterol present in the brain. Unlike other sterol hydroxylases, cholesterol 25-hydroxylase is not a cytochrome P450 but encodes a microsomal enzyme that uses a di-iron cofactor to catalyse the conversion of cholesterol into 25-hydroxycholesterol (Lund et al., 1998).

Oxysterols are both positive and negative regulators of gene expression. 25-Hydroxycholesterol is the most potent oxysterol regulator of gene transcription when assayed *in vitro* and represents the oxysterol most commonly used in regulation studies *in vitro* (Lehmann et al., 1997; Peet et al., 1998). As positive effectors, they bind to and activate the nuclear receptor LXR (Janowski et al., 1996), which was recently shown to be a key regulator of apolipoprotein E (apo E) gene expression in macrophages (Laffitte et al., 2001). Cholesterols, especially 25-hydroxycholesterol, stimulate apo E synthesis in macrophages (Mazzone et al., 1989; Laffitte et al., 2001), whereas they have no effect in hepatoma cells (Tam and Ramharack, 1992; Brahimi et al., 2001).

In the central nervous system (CNS), apo E is synthesized and secreted primarily by astrocytes (Beffert et al., 1998). Astrocytes, like microglia, become activated in response to various pathological insults and such activation is prominent in AD and in other neurodegenerative conditions (Mrak et al., 1995; Nilsson et al., 1998). Apo E is the major apolipoprotein synthesized in the brain, where its main function is to recycle cholesterol and phospholipids locally, in response to injury (Beffert et al., 1998). Three common variants of apo E are present in the human population – apo E2, E3, and E4 – and the allelic frequency of the ε4 allele is positively correlated with increased risk and decreased age of onset of AD. Moreover, apo E has been localized in senile plaques and neurofibrillary tangles, the hallmarks of AD. Apo E binds directly to Aβ as well as tau protein (for a review, see Beffert et al., 1998).

However, little is known about the effects of cytokines or oxidative stress products such as oxysterols on astrocytic apo E metabolism (Oropeza et al., 1987; Baskin et al., 1997; Starck et al., 2000). It was suggested that chronic activation of astrocytes and/or exposure to increased levels of inflammatory cytokines present in affected brain areas might compromise the ability of astrocytes to supply optimal levels of apo E in AD (Bertrand et al., 1995).

In addition, it is also interesting to examine the known stimulatory effects of cholesterol on astrocytic apo E secretion (Krul and Tang, 1992), since the cerebral concentration of cholesterol is decreased in the AD brain (Wurtman, 1992). The aim of this study was to examine the effects of cholesterol, 25-hydroxycholesterol, and proinflammatory cytokines on apo E secretion in human astrocytic cells, specifically to provide data regarding mechanisms of control of apo E production by astrocytes, to afford some information as to its role in neural cell development and repair.

Materials and methods

Materials

Plasticware used for cell culture was from Costar (Cambridge, MA, USA). Cell culture medium, glutamine, antibiotics, cholesterol and 25-hydroxycholesterol, and peroxidase-conjugated anti-goat antibody were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Human recombinant cytokines were from Pharma Biotechnologie Hannover (Hannover, Germany). Fetal bovine serum (FBS) and the Cytotoxicity Detection Kit based on lactate dehydrogenase (LDH) measurement were from Boerhinger Mannheim (Mannheim, Germany). Molecular weight markers for SDS-PAGE analysis were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Cell culture

Human astrocytoma CCF-STTG1 cells (Barna et al., 1985) obtained from ECACC (Salisbury, Wiltshire, UK) were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 4 mmol/L glutamine, 4.5 g/L glucose, and 1% antibiotics (penicillin, streptomycin, amphotericin in 0.9% sodium chloride). Cells were grown at 37°C in a humidified incubator equilibrated with 5% CO_2. CCF-STTG1 cells were seeded onto six-well plates at a density of 6×10^5 cells/well. At confluence, cells were washed with DMEM without FBS for 24 h to remove traces of FBS. Cells were then incubated in fresh DMEM with or without 25-hydroxycholesterol and cytokines for up to 96 h. The culture medium was collected at 48 and 96 h and frozen at –30°C until needed for ELISA or immunoblot analyses. Cells were recovered in STE (saccharose 0.32 mol/L, Tris 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L) and frozen at –80°C until use.

To assess cell viability, LDH released into the medium by the cells was measured enzymatically according to the manufacturer's instructions with the Cytotoxicity Detection Kit.

Quantitation and analysis of apo E

Apo E secreted in the cell culture medium was determined by a highly sensitive ELISA as previously reported (Starck et al., 2000). Alternatively, secreted proteins were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 12% gel and transferred to a poly(vinyl difluoride) (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). Immunodetection was performed with sheep anti-human apo E antibody (1/5000, Chemicon, Temecula, CA, USA). After incubation with a peroxidase-conjugated anti-goat antibody, specific proteins were visualized by the addition of chemiluminescent substrate (ECL kit, Pierce, Rockford, IL, USA) and blots were exposed to Biomax-ML films (Kodak, Rochester, NY, USA).

Statistical analysis

Each experiment was performed in triplicate and repeated at least once in an independent setting that gave rise to similar results. Representative results are shown. Values were compared using Student's *t*-test, and were considered different for $p < 0.05$.

Results

Compared to untreated cells, the measurement of LDH activity in the culture media did not reveal any significant cytotoxicity whether in the presence of 25-hydroxycholesterol at 2.5 μg/ml or in the presence of cytokines (data not shown). A slight increase of LDH activity was only observed with 10 μg/ml 25-hydroxycholesterol. The various cell treatments carried out (cholesterol, 25-hydroxycholesterol, or cytokines) did not interfere with the dosage of apo E by ELISA.

We began this study by addition of various concentrations of 25-hydroxycholesterol (0.5–10 μg/ml) diluted in ethanol, in order to better characterize the response to this treatment

(figure 1). Ethanol alone (1% as final concentration) did not affect apo E secretion. The stimulation of the secretion of apo E by 25-hydroxycholesterol was maximal at 2.5 μg/ml. In order to better appreciate the time-dependent effects of 25-hydroxycholesterol on apo E secretion, the culture media were recovered after 24, 48, 72, and 96 h of incubation. The stimulation of the secretion of apo E by 25-hydroxycholesterol increased with time and was maximal after 4 days of treatment (Figure 2). As already reported by Krul and Tang (1992), cholesterol also stimulated apo E secretion, although to a lesser extent than its metabolite 25-hydroxycholesterol. As for 25-hydroxycholesterol, the effect of cholesterol was also time-dependent (data not shown).

We then wanted to characterize the effect of cytokines in absence or in presence of 25-hydroxycholesterol. When the cells were treated with cytokines alone, we observed a slight nonsignificant increase of the secretion of apo E in the presence of IL-1β and a slight nonsignificant reduction in the presence of IL-6 (Figure 3). The presence of TNF-α significantly inhibited apo E secretion by 50%. In the presence of 25-hydroxycholesterol, IL-1β did not exhibit any effect, whereas IL-6 caused a nonsignificant inhibition of 20% (Figure 4A). TNF-α completely reversed the induction caused by 25-hydroxycholesterol (Figure 4A). We tested IL-2 in various conditions; this cytokine was devoid of any significant effects

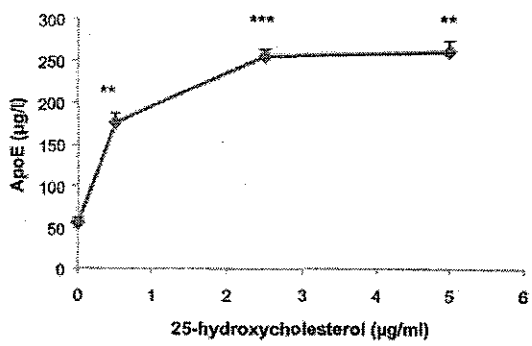


Figure 1. Dose-related effects of 25-hydroxycholesterol on apo E secretion by CCF-STTG1 cells. CCF-STTG1 cells were incubated in DMEM without FCS supplemented with increasing concentrations of 25-hydroxycholesterol (0.5, 2.5, and 5 μg/ml) for 96 h. Secreted apo E (ng/ml) was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean ± SEM of triplicates. Similar results were obtained in one independent experiment. $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$, significantly different from the control group by Student's *t*-test.

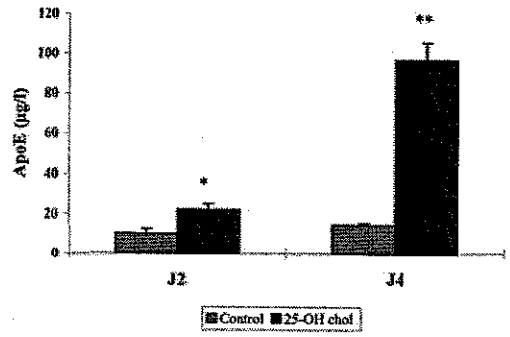


Figure 2. Time-dependent effects of 25-hydroxycholesterol on apo E secretion by CCF-STTG1 cells. CCF-STTG1 cells were incubated without (control) or with 25-hydroxycholesterol (25-OH chol) (2.5 μg/ml) for 48 or 96 h. Results are expressed as mean ± SEM of triplicates. Similar results were obtained in three independent experiments. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, significantly different from control by Student's *t*-test.

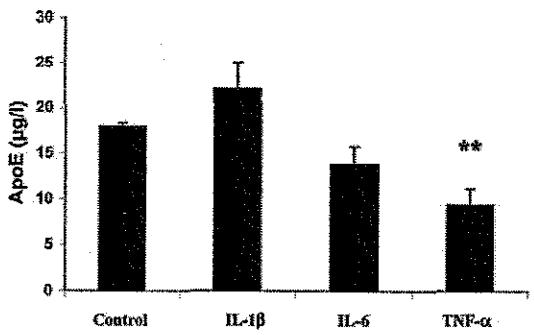


Figure 3. Effects of proinflammatory cytokines on apo E secretion by CCF-STTG1 cells. CCF-STTG1 cells were untreated (control) or incubated with IL-1β, IL-6 (10 ng/ml), or TNF-α (25 ng/ml) for 96 h. Results are expressed as mean ± SEM of triplicates. Similar results were obtained in three independent experiments. $^{**}p<0.01$, significantly different from Control by Student's *t*-test.

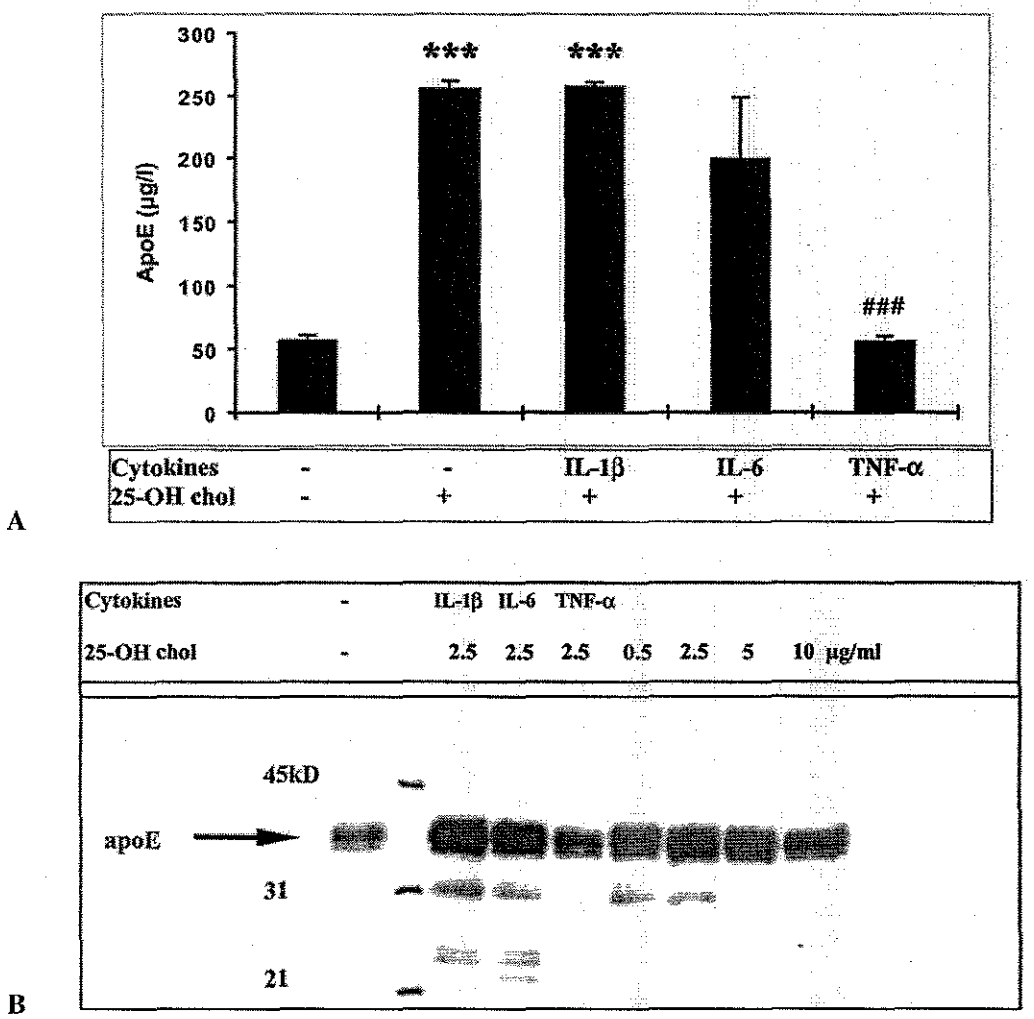


Figure 4. Effects of proinflammatory cytokines on apo E secretion by CCF-STTG1 cells in the presence of 25-hydroxycholesterol. CCF-STTG1 cells were left untreated or treated with 25-hydroxycholesterol (25-OH chol) (2.5 µg/ml) alone or with IL-1β, IL-6 (10 ng/ml), or TNF-α (25 ng/ml) for 96 h. Similar results were obtained in two independent experiments. (A) Apo E secretion measured by ELISA. Results are expressed as mean ± SEM of triplicates. $^{***}p<0.001$, significantly different from Control by Student's *t*-test. $^{###}p<0.001$, significantly different from 25-hydroxycholesterol alone by Student's *t*-test. (B) Apo E secretion followed by immunoblotting. Cell culture media were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting using an anti-apo E antibody. The protein band corresponding to apo E is indicated by an arrow. As estimated using Bio-Rad molecular weight standards, apo E appears in the shape of a double band of molecular weight between 37 and 39 kDa due to the differential sialylation of the protein.

whether applied with or without 25-hydroxycholesterol (data not shown).

The induction of the secretion of apo E by 25-hydroxycholesterol and its inhibition by TNF-α, but not by IL-1β or IL-6, were confirmed by immunorevelation with a polyclonal anti-apo E antibody (Figure 4B). We observed similar results to those obtained by

ELISA with a monoclonal anti-apo E antibody. Apo E appeared in the shape of a double band of similar molecular weights because of differential sialylation. In addition, we observed additional bands of lower molecular weights that could correspond to a slight degradation of apo E in the culture medium. These bands appeared only for the treatment that involved the strongest induction of apo E secretion. The inhibition of the secretion of apo E by TNF-α did not appear to be caused by degradation of the protein.

In the corresponding cellular homogenates, we evaluated the intracellular apo E content by ELISA. The mean apo E cell content was 2 ng per well (10 μg/mg cell protein), while the mean amount of apo E secreted for 48 h was 100 ng per well, corresponding to an extracellular/intracellular ratio of 50. Thus, in agreement with the kinetics of apo E release in culture medium (increasing linearly with time for at least 4 days of incubation (Starck et al., 2000), the major part of the apo E synthesized by the cells seems to be secreted and not to accumulate in the cells. Furthermore, this apo E cell content did not appear to be modulated by any treatment.

Discussion

In AD, the hippocampal levels of apo E tend to decrease; this is particularly marked in the presence of the ε4 allele, the major genetic risk factor for developing AD (Bertrand et al., 1995). Among several hypotheses, this reduction in hippocampal levels of apo E in AD could be the result of the deterioration of the control of apo E cerebral expression. Effectively, in AD, the content of cholesterol and choline in the brain is decreased by up to 50% (Wurtman, 1992). The composition and membrane fluidity as well as the cholinergic markers are decreased, which could result in a less sustained production of apo E in AD. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol stimulated the secretion of apo E in CCF-STTG1 cells (Krul and Tang, 1992; this study) and macrophages (Laffitte et al., 2001), but not in HepG2 cells (Tam and Ramharack, 1992; Brahimi et al., 2001). The time-dependence of both cholesterol and 25-hydroxycholesterol stimulatory effects in CCF might be related to an indirect effect or correspond to the progressive recruitment of intracellular factors controlling the expression of apo E. Both cholesterol and 25-hydroxycholesterol effects could occur via the sterol regulatory element-binding protein (SREBP) pathway (Lund et al., 1998; Laffitte et al., 2001).

Oxysterol, such as 24-hydroxycholesterol primarily and, to a lesser extent, 25-hydroxycholesterol exhibit neuronal toxicity in various neuronal cell models (Chang and Liu, 1998; Kolsch et al., 1999). On the other hand, measurement of levels of LDH in the supernatant of the cells did not show toxicity and no study to date has highlighted astrocyte toxicity of 25-hydroxycholesterol in our range of concentrations (0.5–5 μg/ml) that induced apo E secretion. We hypothesize that 25-hydroxycholesterol has a neuroprotective action by inducing the production of apo E by astrocytes, which could counterbalance its neurotoxic effect.

The concentrations of cytokines used in this study are compatible with the concentrations found in the CSF (Mrak et al., 1995) and correspond to those usually found in the literature (Baskin et al., 1997; Kordula et al., 1998). As we reported previously in an independent set of experiments (Starck et al., 2000), IL-1β did not affect basal apo E secretion, while TNF-α significantly reduced it. In addition, we observed in the present work that IL-6 as well as IL-2 did not affect this parameter, suggesting that apo E secretion in the cells is modulated by a limited number of cytokines. In conditions of stimulated apo E secretion (25-hydroxycholesterol), the relative potency

of these cytokines on apo E secretion was preserved. In particular, TNF-α was able to completely overcome the stimulatory effect of 25-hydroxycholesterol.

IL-1β and IL-6 had nonsignificant effects on apo E secretion. A lack of effect of IL-1β on apo E secretion, similar to that observed in CCF-STTG1 cells, was also described in human primary astrocytes cultures by Baskin et al. (1997). However, the lack of effect of IL-6 on apo E secretion in CCF-STTG1 cells might be due to a defective ability of these cells to exhibit IL-6 related regulatory mechanisms normally present in human astrocytes as was shown for α_1-antichymotrypsin regulation (Kordula et al., 1998). To diversify our approach, we assessed IL-1β and IL-6 effects on apo E secretion in another human glial cell line, U373-MG. IL-1β stimulated the secretion of apo E in U373-MG cells, while IL-6 had no effect (Malaplate-Armand et al., 2000). The divergence between the two glial cell lines CCF-STTG1 and U373-MG may be explained by some neuronal phenotypic markers observed in the predominantly glial U373-MG cells (Tlhyama et al., 1993), whereas CCF cells would be closer to astrocytic cells. Specific studies are required to understand why the effects of some cytokines, namely IL-1β and IL-6, appear to be so variable depending on the cell model and/or the study considered. A similar variability of the effects of these two cytokines on apo E expression was also observed in hepatic cell models (Brahimi et al., 2001, and references therein).

Other proinflammatory cytokines such as IFN-γ and TNF-α decreased the production of apo E by astrocytic cells (Oropeza et al., 1987; Starck et al., 2000; this study). Inhibition of apo E secretion by TNF-α or IFN-γ was also described in macrophages (Zuckerman et al., 1992; Brand et al., 1993). However, these two cytokines differ in their effects in at least two ways: IFN-γ inhibits apo E secretion by promoting cellular retention of the protein in macrophages and astrocytes (Oropeza et al., 1987; Brand et al., 1993), and this inhibition is dependent on the presence of FBS in CCF-STTG1 cells, while TNF-α effects are independent of these criteria (Starck et al., 2000; this study).

In conclusion, the panel of cytokines studied modulate apo E secretion in seemingly similar patterns in astrocytes and macrophages (Oropeza et al., 1987; Zuckermann et al., 1992; Brand et al., 1993; Starck et al., 2000). However, they modulate apo E secretion by hepatic cells in a different way (Brahimi et al., 2001). Further studies are now warranted to explore transduction signals used by cytokines to modulate apo E expression and secretion. It will also be important to understand the differences between these cytokine effects in various cell model systems. It may also be possible to identify the autocrine role played by endogenous cytokine production in the cells under scrutiny, as was recently evidenced both *in vivo* and *in vitro* for IL-6 (Van Lenten et al., 2001), to help develop new specific drug candidates.

Taken together, these results support the assumption that inflammatory reactions leading to a chronic astrocytic activation and/or the exposure of these cells to high concentrations of cytokines could contribute to decreasing the cerebral levels of apo E in AD. In this process, TNF-α, and likely IFN-γ, would have an important role in AD (Bhojak et al., 2000; Collins et al., 2000; Tarkowski et al., 2000) by reducing apo E production in the brain (Starck et al., 2000; this study). This would compromise the promotion of reactive synaptogenesis, affect the lipid homeostasis of the cholinergic neurons, and decrease the cholinergic neurotransmission, whether directly or in conjunction with a global deterioration of cerebral cholesterol pools (Beffert et al., 1998; Wurtman, 1992).

Several cytokines and acute-phase proteins present in amyloid deposits, such as α_1-antichymotrypsin and apo E, seem to be involved

in the pathological cascade leading to AD (Nilsson et al., 1998). Cytokines may perturb the balance between those Aβ-associated proteins that prevent fibril formation and those that stimulate it. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) seem to be good therapeutic candidates in AD; some of their beneficial effects may be related specifically to a decrease in the secretion or action of pro-inflammatory cytokines (Eikelenboom et al., 1998; Blom et al., 1997).

In conclusion, using human astrocytoma CCF-STTG1 cells as a model, this study shows the existence of a dual control of the production of apo E by factors involved in AD by proinflammatory cytokines and cholesterol. The reduction of cerebral levels of apo E by some cytokines, coupled to a reduction of cholesterol concentrations, can contribute to impaired synaptic plasticity and to decreased cholinergic transmission, which finally promotes the development of AD. However, oxidized products of cholesterol may, to some extent, counteract this reduction.

Acknowledgments

Y. Gueguen was supported by the Région Lorraine. The authors acknowledge S. Pepin for technical assistance.

References

Barna BP, Chou SM, Jacobs B, et al. Enhanced DNA synthesis of human glial cells exposed to human leukocyte products. J Neuroimmunol, 1985;10(2):151–8.

Baskin F, Smith GM, Fosmire JA, Rosenberg RN. Altered apolipoprotein E secretion in cytokine treated human astrocyte cultures. J Neurol Sci. 1997;148(1):15–8.

Beffert U, Danik M, Krzywkowski P, Ramassamy C, Berrada F, Poirier J. The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. Brain Res Brain Res Rev. 1998;27(2):119–42.

Bertrand P, Poirier J, Oda T, Finch CE, Pasinetti GM. Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. Brain Res Mol Brain Res. 1995;33(1):174–8.

Bhojak TJ, DeKosky ST, Ganguli M, Kamboh MI. Genetic polymorphisms in the cathespin D and interleukin-6 genes and the risk of Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2000; 288(1):21–4.

Blom MA, van Twillert MG, de Vries SC, et al. NSAIDS inhibit the IL-1 beta-induced IL-6 release from human postmortem astrocytes: the involvement of prostaglandin E2. Brain Res. 1997;777(1–2):210–8.

Brahimi F, Bertrand P, Starck M, Galteau MM, Siest G. Control of apolipoprotein E secretion in the human hepatoma cell line KYN-2. Cell Biochem Funct. 2001;19(1):51–8.

Brand K, Mackman N, Curtiss LK. Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms. J Clin Invest. 1993;91(5):2031–9.

Chang JY, Liu LZ. Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. Neurochem Int. 1998; 32 (4):317–23.

Collins JS, Perry RT, Watson B, et al. Association of a haplotype for tumor necrosis factor in siblings with late-onset Alzheimer disease: the NIMH Alzheimer Disease Genetics Initiative. Am J Med Genet. 2000; 6(6):823–30.

Du Y, Dodel RC, Eastwood BJ, et al. Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease. Neurology. 2000;55(4):480–3.

Eikelenboom P, Rozemuller JM, Van Muiswinkel FL. Inflammation and Alzheimer's disease: relationships between pathogenic mechanisms and clinical expression. Exp Neurol. 1998;154(1):89–98.

Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. Free Radic Biol Med. 1999;26(9–10):1346–55.

Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. Nature. 1996;383(6602):728–31.

Kolsch H, Lutjohann D, Tulke A, Bjorkhem I, Rao ML. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Brain Res. 1999;818(1):171–5.

Kordula T, Rydel RE, Brigham EF, Horn F, Heinrich PC, Travis J. Oncostatin M and the interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor complex regulate alpha1-antichymotrypsin expression in human cortical astrocytes. J Biol Chem. 1998;273(7):4112–8.

Krul ES, Tang J. Secretion of apolipoprotein E by an astrocytoma cell line. J Neurosci Res. 1992;32(2):227–38.

Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98 (2):507–12.

Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. J Biol Chem. 1997;272(6):3137–40.

Lund EG, Kerr TA, Sakai J, Li WP, Russell DW. cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism. J Biol Chem. 1998;273(51): 34316–27.

Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Bjorkhem I, et al. Plasma 24*S*-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. J Lipid Res. 2000;41(2):195–8.

Malaplate-Armand C, Gueguen Y, Bertrand P, Ferrari L, Batt AM. U373-MG response to interleukin-1beta-induced oxidative stress. Cell Biol Toxicol. 2000;16(3):155–63.

Mark RJ, Blanc EM, Mattson MP. Amyloid beta-peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease. Mol Neurobiol. 1996;12(3):211–24.

Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Ann NY Acad Sci. 1999; 893:154–75.

Mazzone T, Basheeruddin K, Poulos C. Regulation of macrophage apolipoprotein E gene expression by cholesterol. J Lipid Res. 1989;30(7):1055–64.

Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. Hum Pathol. 1995;26(8):816–23.

Murray CA, Lynch MA. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. J Neurosci. 1998;18(8):2974–81.

Nilsson L, Rogers J, Potter H. The essential role of inflammation and induced gene expression in the pathogenic pathway of Alzheimer's disease. Front Biosci. 1998;3:d436–46.

Oropeza RL, Wekerle H, Werb Z. Expression of apolipoprotein E by mouse brain astrocytes and its modulation by interferon-gamma. Brain Res. 1987;410(1):45–51.

Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. Curr Opin Genet Dev. 1998;8(5): 571–5.

Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J. 1996;10(7):709–20.

Starck M, Bertrand P, Pepin S, Schiele F, Siest G, Galteau MM. Effects of pro-inflammatory cytokines on apolipoprotein E secretion by a human astrocytoma cell line (CCF-STTG1). Cell Biochem Funct. 2000;18(1):9–16.

Tam SP, Ramharack R. The effect of 25-hydroxycholesterol on the regulation of apolipoprotein E mRNA levels and secretion in the human hepatoma HepG2. Atherosclerosis. 1992; 95(2–3):137–46.

Tarkowski E, Liljeroth AM, Nilsson A, et al. TNF gene polymorphism and its relation to intracerebral production of TNFalpha and TNFbeta in AD. Neurology. 2000;54(11): 2077–81.

Tihyama T, Lee VM, Trojanowski JQ. Co-expression of low molecular weight neurofilament protein and glial fibrillary acidic protein in established human glioma cell lines. Am J Pathol. 1993;142(3):883–92.

Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, Fogelman AM. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and apo J but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. J Biol Chem. 2001;276(3):1923–9.

Wurtman RJ. Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons. Trends Neurosci. 1992; 15(4):117–22.

Zuckerman SH, Evans GF, O'Neal L. Cytokine regulation of macrophage apo E secretion: opposing effects of GM-CSF and TGF-beta. Atherosclerosis. 1992;96(2–3):203–14.

Address for correspondence: Professor G. Siest, INSERM U525 (Equipe 4), Centre du Médicament, Université Henri Poincaré, Nancy 1, 30, rue Lionnois, 54 000 Nancy, France.
E-mail: siest@ctrmed.u-nancy.fr

PUBLICATION N°4

U373-MG response to interleukin-1β-induced oxidative stress

MALAPLATE-ARMAND C., GUEGUEN Y, BERTRAND P., FERRARI L AND BATT A-M

Cell Biol Toxicol (2000)

Cell Biology and Toxicology, 2000; **16**: 155–163.
© 2000 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands*

U373-MG response to interleukin-1β-induced oxidative stress

C. Malaplate-Armand, Y. Gueguen, P. Bertrand, L. Ferrari and A.M. Batt
Centre du Médicament, UPRES 3117, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré, Nancy, France

Received 1 December 1999; accepted 7 April 2000

Keywords: AP-1, apoE, astrocytoma, GGT-GSH system, IL-1β, oxidative stress

Abstract

Oxidative stress has been involved in various neurological disorders and, in the central nervous system, astrocytes represent the cell type that contributes to neuroprotection via glutathione (GSH) metabolism, GSH-metabolizing enzymes like γ-glutamyltransferase (GGT), and apoE secretion. In this study, using IL-1β, a proinflammatory and prooxidant cytokine that is increased in numerous pathological situations, cells of astrocytoma cell line U373-MG were exposed to an oxidative stress, leading to c-Jun and c-Fos activation. IL-1β decreased both GGT activity and intracellular GSH content and increased apoE secretion, initiating astroglial response to injury. We observed that antioxidants inhibit IL-1β effects on c-Jun and c-Fos proteins, GGT activity and the GSH pool but not on apoE secretion. Our results allow us to conclude that neurological disorders associated with an IL-1β-induced oxidative stress could be, at least experimentally, reversible in the presence of one antioxidant, *N*-acetylcysteine.

Abbreviations: AD, Alzheimer disease; Aβ, amyloid β; apoE, apolipoprotein E; CNS, central nervous system; Cys-Gly, cysteinylglycine; GGT, γ-glutamyltransferase; GSH, glutathione; IL-1β, interleukin-1β; LDH, lactate dehydrogenase; NAC, *N*-acetylcysteine; ROS, reactive oxygen species; α-TO, α-tocopherol; TPA, 12-*O*-tetradecanoyl phorbol acetate

Introduction

Oxidative stress is an intracellular overproduction of reactive oxygen species (ROS) that can oxidize proteins, lipids, RNA, and DNA and lead to pathological situations (Bonofoco et al., 1995). In the brain, ROS production is involved, at least partially, in neurological injuries like neurodegenerative diseases, epilepsy, trauma, or stroke (Wilson, 1997). Oxidation can be the result of many physiological and pathological stimuli (Morel and Barouki, 1999). In CNS, IL-1β possesses physiological properties (cell homeostasis, growth and differentiation), but dysregulation of its production participates in neurodegenerative diseases or postischemic damage (Morganti-Kossmann et al., 1992). Oxidation causes many molecular modifications, in particular in transcription factors regulation (NFκB, AP-1, etc.) (Morel and Barouki, 1999). The AP-1 transcription factor family consists of two groups of proteins, Fos and Jun proteins (Pennypacker et al., 1994). *fos* and *jun* are immediate early genes induced rapidly but transiently after various stimula-

tions, as by cytokines such as IL-1β (Karin et al., 1997). AP-1 activation causes generally an increased AP-1 DNA binding activity and a regulation of genes that are implicated in injury response such as those for antioxidant enzymes (Pennypacker et al., 1994).

In nervous tissue, astrocytes contribute actively to the protection against ROS. They are involved not only in synaptic transmission (Murphy et al., 1993) and scarring processes (Kloss et al., 1997) but also in fighting against free radical toxicity owing to their ability to accumulate endogenous antioxidants like GSH (Lowndes et al., 1994) and to enzymes of GSH metabolism such GSH peroxidase (Huang and Philbert, 1995). Among the GSH-metabolizing enzymes, γ-glutamyltransferase (GGT) plays a crucial role in GSH metabolism, hydrolyzing GSH to Cys-Gly in order to supply the cellular pool (Orlowski and Meister, 1970). In rat astrocytes, inhibition of GGT by acivicine produces an increased amount of GSH in incubation medium (Dringen et al., 1997); but GGT uses as substrate the GSH released by astrocytes to generate Cys-Gly that is subsequently used by neurons as precursor for GSH synthesis. Decrease in astroglial GGT causes a decrease in GSH content in neighboring neurons (Dringen et al., 1999). GGT also contributes to the cellular redox steady state and detoxification of xenobiotic–GSH conjugates (Curthoys and Hughey, 1979).

In addition, astrocytes produce other proteins that play a major role in fighting against oxidative stress, such as apolipoprotein E (apoE). Human apoE is a polymorphic protein (Mahley, 1988). The differential implications of apoE isoforms in Alzheimer (AD), particularly the ε4 allele (Poirier, 1994; Siest et al., 1995), may be reinforced or correlated with the differential modifications of apoE isoforms due to oxidative modifications (Jolivalt et al., 2000). Moreover, amyloid β (Aβ) aggregates, a hallmark of AD, produce free radicals (Hensley et al., 1994) and the colocalized apoE could be a target for the attack of these radicals and may even function as a local antioxidant (Miyata and Smith, 1996). ApoE, postulated to be a major lipid carrier protein in brain, is synthesized and secreted primarily by astrocytes (Boyles et al., 1985) and is involved in brain development and repair (Poirier, 1994). Thus, cytokines like IL-1β could influence the secretion of this protein by astrocytic cells.

By using IL-1β, we created an oxidative stress in U373-MG cells, leading to c-Jun and c-Fos activation. U373-MG is a human astrocytoma cell line that retains morphological and physiological properties of primary astrocytes, including the ability to respond to IL-1β stimulation (Lieb et al., 1996) and sensitivity to Aβ (Gitter et al., 1995). Spontaneous cell defenses were examined by following the GGT-GSH system and apoE secretion. Possible therapeutic cell defenses were studied after treatment with antioxidants, especially *N*-acetylcysteine (NAC).

Methods

Cell lines and culture

The human glioma U373-MG cell line was obtained from ATCC and cells were cultivated according to Ponten and Macintire (1968). Cells were seeded in Dulbecco's modified Eagle Medium, 10% fetal calf serum and antibiotics (penicillin 10 U/ml and streptomycin 10 mg/ml).

Nuclear extract

Cells were treated in serum-free medium with TPA (100 nM) for 60 min as positive control, or IL-1β (1 ng/ml) with or without NAC (0.1 mmol/L) and scraped in cold PBS on ice. Nuclear extracts were prepared according to Dignam et al. (1983). Protein was determined according to Lowry et al. (1951) after a precipitation step.

c-Jun and c-Fos western blotting analysis

Proteins (5 μg) were mixed with denaturant blue and boiled for 5 min. Samples were then subjected to SDS–polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred to a blot membrane (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA) and revealed with anti c-Fos (c-Fos (K-25), sc-253) or anti c-Jun (c-Jun/AP-1 (N), sc-45) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) followed by enhanced chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, USA).

γ-Glutamyltransferase determination

Five hours before treament, culture medium was replaced with serum-free DMEM. Recombinant human IL-1β (Strathman Biotech GmbH, Hamburg, Germany) or/and antioxidants were added to the supernatant, and medium was renewed every 24 h.

First, IL-1β was used at increased concentrations (0.01, 0.1, 1, and 10 ng/ml) for 24, 48, and 72 h. Secondly, U373-MG cells were treated with IL-1β (1 ng/ml) with increasing concentrations of NAC (0.01, 0.1, and 1 mmol/L), α-tocopherol (1, 10, and 100 μmol/L), or ascorbic acid (1, 10, and 100 μmol/L). GGT was determined spectrophotometrically in cellular homogenates using γ-glutamyl-3-carboxy 4-nitroanilide as a substrate according to Szasz (1969). Proteins were determined in cellular homogenates according to Lowry et al. (1951).

Glutathione assay

After treatment with IL-1β (1 ng/ml) and/or NAC (0.1 mmol/L), for 1, 24, and 48 h, cells were scraped in ice-cold perchloric acid. GSH determination was done in supernatant by HPLC according to Leroy et al. (1993); pellets were used for protein determination according to Lowry et al. (1951).

ApoE determination

After removal of culture medium, cells were subjected to increasing concentrations of IL-1β (0.01, 0.1, 10, and 40 ng/ml) with or without NAC (0.1 mmol/L). Following incubation for 48 or 96 h, supernatants were collected and stored at –20°C until apoE determination.

ApoE was quantified in cell culture medium using the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) described by Starck et al. (2000).

Statistical analysis

Student's *t*-test was used for statistical analysis.

Results

U373-MG viability

IL-1β cytotoxicity toward U373-MG cell line was assessed using the MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) colorimetric test (Langeveld et al., 1995) or LDH assay (Boehringer Mannheim, according manufacturer's procedures). We did not observe any effect on cell viability except after 72 h treatment with 10 ng/ml of IL-1β (data not shown). We observed an increase in LDH release into the extracellular medium after 48 h treatment with 1 ng/ml of IL-1β (data not shown).

Western blotting analysis

Expression of c-Fos and c-Jun in U373-MG nuclei was examined by western blotting analysis. Identities of the c-Fos and c-Jun proteins were confirmed by the positive control from cells treated with TPA (Figure 1, lane 2; Figure 2, lanes 2 and 3). Figure 1 (lane 2) shows that TPA increased another protein that was not identified.

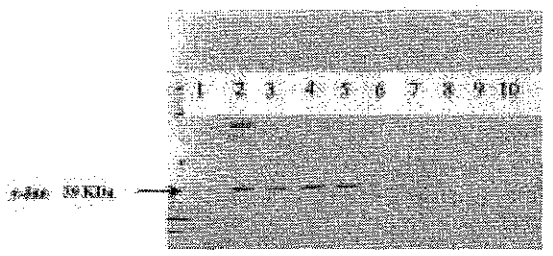


Figure 1. c-Jun western-blotting analysis in U373-MG cells after treatment with TPA, IL-1β, and NAC. 5 μg of proteins was loaded in each lane. Before nuclear extraction, cells were treated as follows: lane 1, no treatment (negative control); lane 2, TPA (100 nmol/L) (positive control); lanes 3, 4, 5, and 6, IL-1β (1 ng/ml) during respectively 15, 30, 60, and 180 min; lanes 7, 8, 9, and 10, IL-1β (1 ng/ml) + NAC (0.1 mmol/L) during respectively 15, 30, 60, and 180 min.

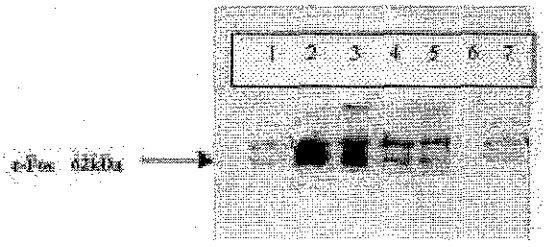


Figure 2. c-Fos western-blotting analysis in U373-MG cells after treatment with TPA, IL-1β and NAC during 1 h. 5 μg of proteins were loaded. Before nuclear extraction, cells were treated as follows: lane 1, no treatment (negative control); lanes 2 and 3, TPA (100 nmol/L) (positive control); lanes 4 and 5, IL-1β (1 ng/ml); lane 6, NAC (0.1 mmol/L); lane 7, NAC (0.1 mmol/L)+ IL-1β (1 ng/ml).

c-Jun is not constitutively present in the U373-MG cell nucleus. IL-1β (1 ng/ml) caused a rapid but transient increase in c-Jun in nuclear extracts. The increase was time-dependent, starting after 15 min and being maximal at 60 min. After 3 h, c-Jun had disappeared in the nucleus. In the presence of NAC and whatever the time of treatment, the IL-1β effect was suppressed (see Figure 1).

Figure 2 shows that c-Fos is not present constitutively in the U373-MG cell nucleus (lane 1), but after IL-1β treatment we observed a rapid increase of c-Fos in nuclear extracts (lanes 4 and 5). The increase was reversible in the presence of NAC (0.1 mmol/L) (lanes 6 and 7).

IL-1β effect on GGT activity

GGT activity variations were studied with increasing concentrations of IL-1β (0.01, 0.1, 1, and 10 ng/ml) and during 24, 48, and 72 h (Figure 3). Control GGT activity in U373-MG cells was 10 ± 2 nmol/min per mg protein. GGT regulation by IL-1β began after 24 h treatment (–40% with 10 ng/ml of IL-1β); after 48 h or 72 h treatment, IL-1β produced a dose-dependent decrease in GGT activity reaching 50–60% with 10 ng/ml of IL-1β.

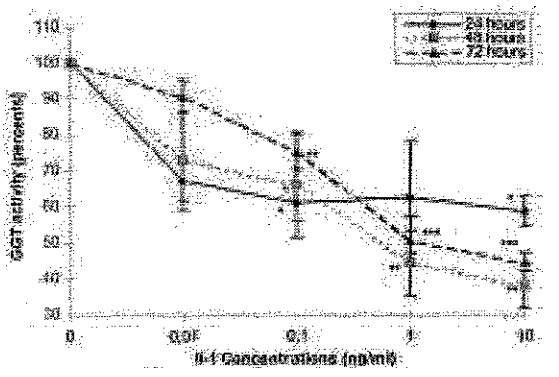


Figure 3. IL-1β effect on GGT activity in U373-MG cells. U373-MG cells were treated with increasing concentrations (0.01, 0.1, 1, and 10 ng/ml) during 24, 48, and 72 h and decrease in GGT activity was measured. Control GGT activity was 10 ± 2 mmol/min per mg of protein. Significantly different from control at $^{*}p \leqslant 0.05$, $^{**}p \leqslant 0.01$, $^{***}p \leqslant 0.001$, $n = 3$.

Antioxidant treatments

NAC, α-tocopherol (α-TO), and ascorbate, were tested for their ability to protect GGT against the effect of IL-1β. U373-MG cells were treated with IL-1β (1 ng/ml) with increasing concentrations of NAC (0.01, 0.1, and 1 mmol/L), α-tocopherol (1, 10, and 100 μmol/L), or ascorbate (1, 10 and 100 μmol/L) during 48 h (Figure 4).

In the absence of antioxidants, IL-1β repressed GGT activity by 50% (Figure 4A). NAC partially restored GGT activity (20%),

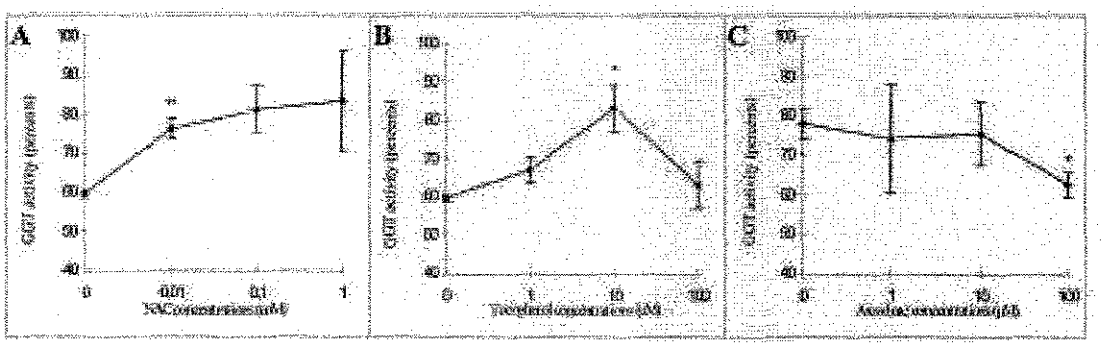


Figure 4. Antioxidant protection against IL-1β effect on GGT activity in U373-MG cells. U373-MG cells were treated with IL-1β (1 ng/ml) during 48 h with increasing concentrations of NAC (0.01, 0.1, and 1 mmol/L), α-tocopherol (1, 10, and 100 μmol/L), and ascorbate (1, 10, and 100 μmol/L). Significantly different from control at $*p \leqslant 0.05$, $**p \leqslant 0.01$, $n = 3$.

whatever the dose. Likewise, α-TO protected GGT against IL-1β in a dose-dependent way. α-TO 100 μmol/L did not protect GGT activity, probably because of α-TO toxicity at high concentration (Figure 4B). Ascorbate did not protect GGT activity and even caused an additional decrease of the GGT activity with 100 μmol/L of ascorbate (Figure 4C).

Intracellular GSH level

Cells were treated with IL-1β (1 ng/ml) or NAC (0.1 mmol/L) during 1, 24, and 48 h. GSH control level in U373-MG cells was 9 mmol/L per mg of protein.

After 1 h or more, IL-1β caused a significant decrease in intracellular GSH level (30%). NAC alone had no effect on intracellular GSH. NAC used in cotreatment with IL-1β restored the GSH pool after 48 h treatment (Figure 5).

IL-1β effect on apoE secretion

In basal conditions, the secretion of apoE by the U373-MG cell line was very weak (1–2 ng/ml for 48 h). After treatment with increasing concentrations of IL-1β (0.01–40 ng/ml), we observed increased apoE secretion by these astrocytoma cells (Figure 6). The increased secretion of apoE caused by IL-1β was both dose- and time-dependent. Treatment with NAC (0.1 mmol/L) had no effect on apoE secretion, either alone or in association with IL-1β (Figure 7).

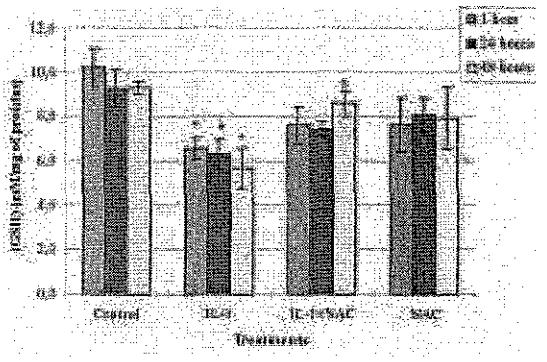


Figure 5. IL-1β effect on intracellular GSH in U373-MG cells. NAC protective effect. U373-MG cells were treated with IL-1β (1 ng/ml) and/or NAC (0.1 mmol/L) during 1, 24, or 48 h and intracellular GSH levels were measured. Significantly different from control at $*p \leqslant 0.05$, $n = 3$. Significantly different from IL-1β alone at $\#p \leqslant 0.05$, $n = 3$.

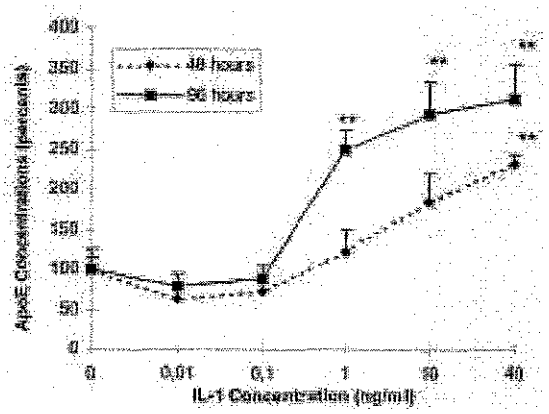


Figure 6. Dose-related effects of IL-1β on apoE secretion by U373-MG cells. U373-MG cells were incubated with increasing concentration of IL-1β (0.01, 0.1, 1, 10, and 40 ng/ml) for 48 to 96 h. In basal conditions, apoE concentration was 1–2 ng/ml. Significantly different from control at $^{**}p<0.01$.

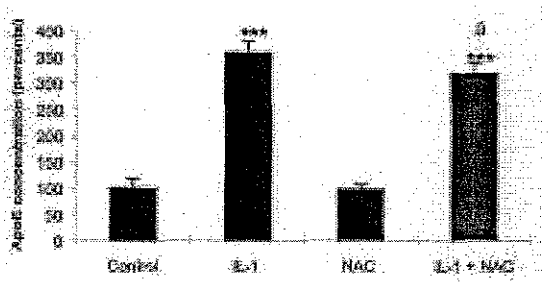


Figure 7. IL-1β and NAC effects on apoE secretion by U373-MG cells. U373-MG cells were incubated with IL-1β (10 ng/ml) or NAC (10^{-4} mol/L) alone or with IL-1β and NAC at the same concentration for 96 h. Significantly different from control at $^{***}p<0.001$. [a]Not significantly different from IL-1β treatment.

Discussion

This investigation emphasizes one of the consequences of the effects of IL-1β in the CNS, especially on astrocytes because of their important part in neuroprotection (Aschner et al., 1999). We studied IL-1β effects on activation of c-Fos and c-Jun proteins. Both were increased in nuclear extracts after treatment with IL-1β. This cytokine is known to induce ROS production and regulate critical steps in the signal transduction cascade (protein phosphorylation, gene expression, NFκB, or AP-1 activation) (Sen and Packer, 1996). The data confirm an oxidative mechanism for IL-1β. In the presence of NAC, IL-1β effects on c-Fos and c-Jun are completely suppressed, suggesting a possible therapeutic effect of NAC as an antioxidant in neurological disorders. AP-1 factors may regulate different target genes and thus execute distinct biological functions (Karin et al., 1997). In neural tissue, AP-1 participates in both physiological and pathological processes and its expression can be related to both death and survival (Herdegen et al., 1997; Herdegen and Leah, 1998). During neuronal pathologies and IL-1β overproduction, AP-1 activation could be a marker not only for toxicity but for cellular defensive response to injuries.

We studied spontaneous astrocytoma defenses. In CNS, GSH plays an important role in the inactivation of ROS involved in the neuronal loss occuring in pathological states (Cooper and Kristal, 1997; Aschner et al., 1999). Therefore, increasing astroglial GSH level may have therapeutic effects (Cooper and Kristal, 1997). Likewise, loss of the antioxidant GSH abolishes the neuronal survival-stimulating action of astrocytes in coculture, implicating a reduced neuronal survival and a crucial role for GSH in this process (Druckarch et al., 1998). Moreover, in brain, GGT has also been shown to be especially abundant in astrocytes (Makar et al., 1994) and to participate in neuronal protection (Dringen et al., 1999). Thus, in U373-MG astrocytoma, IL-1β, by repressing GGT activity, potentially decreases this protection and increases sensitivity to neuronal injuries. It was reported that AP-1 consensus sequences are present in the mouse and rat GGT promoter P2 (Chikhi et al., 1999), suggesting that there could exist a relationship between IL-1β effect on GGT

activity, intracellular GSH level, and AP-1 expression. However, there is no data so far indicating either a repression or an induction of GGT gene via AP-1. In the presence of NAC or α-TO, GGT activity is partially restored, suggesting a possible neuronal protection by these antioxidants. NAC in particular could generate the cysteine necessary for the neuronal GSH pool when astroglial GGT is insufficient or inactivated. These results clearly suggest that maintenance of the thiol/oxidant balance is crucial for protection against IL-1β overproduction in brain. The GSH decrease after IL-1β confirms these observations. In brain, this type of stress hits astrocytes and subsequently decreases neuroprotection (Aschner et al., 1999). Treatment of these cells with NAC restored intracellular GSH level and astrocyte defenses and inhibited the IL-1β prooxidant effect.

In this way, NAC, a nontoxic pharmaceutical drug, could have a therapeutic role in neuroprotection during neurological pathologies associated with a significant IL-1β release. However, NAC and thiol antioxidants have already been used as therapeutic agents in neurological and neurodegenerative diseases like amyotrophic lateral sclerosis (Louwerse et al., 1995; Vyth et al., 1996) or Parkinson disease (Offen et al., 1996). The efficiency of NAC in fighting against ROS was demonstrated but remains clinicaly unproven in humans.

In the CNS, the increase of apoE secretion could also play a protective role against neurodegenerative diseases (Poirier, 1994; LaDu et al., 1994; Jordan et al., 1998). The increased apoE production by IL-1β is not supposed to be the consequence of the release from an intracellular pool, because the intracellular concentration of apoE in U373-MG cells is 13-fold lower than the apoE secreted (data not shown). The apoE is generally found to be downregulated by cytokines, but this is still subject to contradictory results. In fetal brain-derived astrocytes, IL-1β+IFN-γ decreases apoE secretion (Baskin et al., 1997), whereas IL-1β decreases the production of apoE in the hepatoma cell line HepG2 (Berg et al., 1995). Moreover, we observed an increase in this secretion with IL-1β in U373-MG cells as described by Mrak et al. (1995) in adult astrocytes. This suggests that apoE regulation by cytokines is both developmentally and cell-type specific. We showed an AP-1 increase in nuclear extract with IL-1β in parallel with the increased apoE production in the U373-MG cell line, but the addition of NAC restored the basal level of AP-1 whereas it did not have any effect on the production of apoE. Although the AP-1-responsive element is present and has a positive action on the expression of apoE in the monocytic cell line THP-1 (Basheerudin et al., 1993), AP-1 is not involved in apoE regulation in U373-MG cells. This stimulation could also proceed via the activation of other transcription factors: for example, AP-2 which is present on apoE promoter gene in the U87 astrocytoma cell line (Garcia et al., 1996) or BEF-1, which represses the production of apoE in the hepatoma cell line HepG2 (Berg et al., 1995).

All of these results allow us to conclude that part of the IL-1β effect takes place through oxidative stress. This mechanism could participate in many neurological disorders associated with an early increase in IL-1β and could be reversible in the presence of thiol antioxidants like NAC. Moreover, IL-1β and NAC effects on AP-1 allow us to suggest that AP-1 could be a potential therapeutic target in neurological disorders, as has been demonstrated in other pathological situations involving oxidative stress, such as cancer, atherosclerosis, or diabetic complications (Sen and Packer, 1996). Moreover, astrocytes seem to have a crucial role in neuroprotection (Aschner et al., 1999), which could prove an interesting therapeutic approach in neurological diseases.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Wellman and Dr. P. Leroy for their helpful discussion and L. Diez and J.F. Salazar for their technical assistance.

References

Aschner M, Allen JW, Kimelberg HK, LoPachin RM, Streit WJ. Glial cells in neurotoxicity development. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999;39:151–73.

Basheerudin K, Rechtoris C, Mazzone T. Evaluation of the role of AP1-like proteins in the enhanced apolipoprotein E gene transcription accompanying phorbol ester induced macrophage differentiation. Biochim Biophys Acta. 1993;1218: 235–41.

Baskin F, Smith GM, Fosmire JA, Rosenberg RN. Altered apolipoprotein E secretion in cytokine treated human astrocytes cultures. J Neurol Sci. 1997;148:15–8.

Berg DT, Calnek DS, Grinnell BW. The human apolipoprotein E gene is negatively regulated in human liver HepG2 cells by the transcription factor BEF-1. J Biol Chem. 1995;27: 15447–50.

Bonofoco E, Nrainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton S. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with *N*-methyl D-aspartate or nitric oxide-superoxidase in cortical cell culture. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:7162–6.

Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. J Clin Invest. 1985;76:1501–13.

Chikhi N, Holic N, Guellaen G, Laperche Y. Gamma-glutamyl transpeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. Comp Biochem Physiol. 1999;122:367–80.

Cooper AJ, Kristal BS. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. Biol Chem. 1997;378(8):793–802.

Curthoys NP, Hughey RP. Characterization and physiological function of rat renal gamma-glutamyltranspeptidase. Enzyme. 1979;24:383–403.

Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res. 1983;11: 1475–89.

Dringen R, Kranich O, and Hamprecht B. The γ-glutamyltranspeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture. Neurochem Res. 1997;22:727–33.

Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of cysgly as precursor for neuronal glutathione. J Neurochem. 1999; 19(1):562–9.

Drukarch B, Schepens E, Stoof JC, Langeveld CH, Van Muiswinkel FL. Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species. Free Radic Biol Med. 1998;25(2):217–20.

Garcia MA, Vazquez J, Giménez C, Valdivieso F, Zafra F. Transcription factor AP-2 regulates human apolipoprotein E gene expression in astrocytoma cells. J Neurosci. 1996;16: 7550–6.

Gitter BD, Cox LM, Rydel RE, May PC. Amyloid β peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1β-activated human astrocytoma cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92:10738–41.

Hensley K, Hall N, Subramaniam R, et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. J Neurochem. 1994;65:2146–56.

Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos, Krox and CREB/ATF proteins. Brain Res Brain Res Rev. 1998;28(3):370–490.

Herdegen T, Skene P, Bahr M. The c-Jun transcription factor: biopotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. Trends Neurosci. 1997;20(5):227–31.

Huang J, Philbert MA. Cellular response of cultured cerebral astrocytes to ethacrinic acid-induced perturbation of subcellular glutathione homeostasis. Brain Res. 1995;711:184–92.

Jolivalt C, Leininger-Muller B, Bertrand P, Herber R, Christen Y, Siest G. Differential oxidation of apolipoprotein E isoforms and interaction with phospholipids. Free Radic Biol Med. 2000;28(1):129–40.

Jordan J, Galindo MF, Miller RJ, Reardon CA, Getz GS, LaDu MJ. Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and β-amyloid toxicity in rat hippocampal pyramidal neuronal cultures. J Neurosci. 1998;18:1–10.

Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol. 1997;9:240–6.

Kloss CU, Kreutzberg GW, Raivich G. Proliferation of ramified microglia on an astrocytes monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. J Neurosci Res. 1997;49:248–54.

LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to β-amyloid. J Biol Chem. 1994;269:13070–5.

Langeveld CH, Jongenelen CA, Schepens E, Stoof JC, Bast A, Drukarch B. Cultured rat striatal and cortical astrocytes protect mesencephalic dopaminergic neurons against hydrogen peroxide toxicity independent of their effect on neuronal development. Neurosci Lett. 1995;192:13–16.

Leroy P, Nicolas A, Wellman M, Michelet F, Oster T, Siest G. Evaluation of *o*-phthaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC. Chromatographia. 1993;36:130–4.

Lieb K, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA, Berger M, Fiebich BL. Interleukin-1 beta uses common and distinct signaling pathways for induction of interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha genes in the human astrocytoma cell line U373. J Neurochem. 1996;66:1496–503.

Louwerse ES, Weverling GJ, Bossuyt PM, Meyjes FE, De Jong JM. Randomized, double-blind, controlled trial of acetyl-

cysteine in amyotrophic lateral sclerosis. Arch Neurol. 1995; 52(6):559–64.

Lowndes HE, Beiswanger CM, Philbert MA, Reuhl KR. Substrate for neural metabolism of xenobiotics in adult and developing brain. Neurotoxicology. 1994;15:61–73.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ. Protein measurment with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265–75.

Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science. 1988;240:92–4.

Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJL. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. J Neurochem. 1994;62:45–53.

Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. Nat Genet. 1996;14:55–61.

Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. Biochem J. 1999;342:481–96.

Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Wahl SM. Cytokines and neuropathology. TIPS. 1992;13:286–91.

Mrak RE, Sheng JE, Griffin STE. Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implication. Hum Pathol. 1995;26:816–23.

Murphy TH, Blatter LA, Wier WG, Baraban JM. Rapid communication between neurons and astrocytes in primary cortical culture. J Neurosci. 1993;13:2672–9.

Offen D, Ziv I, Sternin H, Melamed E, Hochman A. Prevention of dopamine-induced cell death by thiol antioxidants: possible implications for treatment of Parkinson's disease. Exp Neurol. 1996;141:32–9.

Orlowski M, Meister A. The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino-acids. Proc Natl Acad Sci USA. 1970;67:1248–55.

Pennypacker K, Hong JS, MacMillian MK. Pharmacological regulation of AP-1 transcription factor DNA binding activity. FASEB J. 1994;8:475–8.

Poirier J. Apolipoprotein E in animals models of CNS injury and in Alzheimer's disease. Trends Neurosci. 1994;12:525–30.

Ponten J, Macintire E. Long-term culture of normal and neoplasic human glia. Acta Pathol Microbiol Scand. 1968; 74:465–86.

Sen C, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J. 1996;10:709–20.

Siest G, Pillot T, Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau M-M, Visvikis S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. Clin Chem. 1995;41:1068–86.

Starck M, Bertrand P, Pepin S, Schiele F, Siest G, Galteau MM. Effect of pro-inflammatory cytokines on apolipoprotein E secretion by human astrocytoma cells. Cell Biochem Funct. 2000;18(1):9–16.

Szasz G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transferase. Clin Chem. 1969;5:124–36.

Vyth A, Timmer JG, Bossuyt PM, Louwerse ES, De Jong JM. Survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis, treated with an array of antioxidants. J Neurol Sci. 1996;139(supplement):99–103.

Wilson JX. Antioxidant defense of brain: a role for astrocytes. Can J Physiol Pharmacol. 1997;75:1149–63.

Address for correspondence: Professor Anne-Marie Batt, Centre du Médicament, UPRES 3117, Faculté de Pharmacie, 30, rue Lionnois, 54000 Nancy, France
E-mail: batt@ctrmed.u-nancy.fr

université HENRI POINCARÉ NANCY 1

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

Prénom, Nom : **Yann GUEGUEN**

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie - Santé - Environnement

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER n° 807

Nancy, le 7 avril 2003

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY I LE PRÉSIDENT

Claude BURLET

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1
24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex - Tél. 03 83 85 48 00 - Fax 03 83 85 48 48
Adresse électronique : _____ @uhp-nancy.fr

Impression réalisée
par le Service de Reprographie
de la Faculté de Pharmacie de Nancy

RESUME

Les pathologies cardiovasculaires sont devenues la principale cause de décès chez les patients ayant bénéficié de transplantations d'organes. Ces patients présentent fréquemment une **hyperlipémie post-transplantatoire** caractérisée par une élévation persistante du cholestérol total, du LDL-cholestérol et des triglycérides dus aux **traitements immunosuppresseurs**. La **rapamycine** (RAPA, sirolimus) est un nouvel immunosuppresseur macrolide qui n'engendre pas de néphrotoxicité mais pour lequel persiste une hyperlipidémie tout comme pour la **ciclosporine A** (CsA). Le foie joue un rôle central dans l'homéostasie du cholestérol : il effectue la synthèse du cholestérol, participe au transport du cholestérol *via* les lipoprotéines et est l'organe essentiel de la transformation du cholestérol en acides biliaires. L'objectif de notre travail est d'identifier les mécanismes responsables de ces effets secondaires hyperlipémiants causés par la RAPA et la CsA dans la lignée cellulaire HepG2.

Dans un premier temps nous avons étudié l'effet de ces immunosuppresseurs sur le métabolisme du cholestérol. La synthèse hépatique des acides biliaires, à partir du cholestérol, est la voie principale d'élimination du cholestérol. Plusieurs cytochromes P450 dont le CYP27A1 jouent un rôle clé dans cette voie métabolique. Le mécanisme d'**inhibition de l'activité CYP27A1** par la CsA et la RAPA a été approfondi par la réalisation de cinétiques enzymatiques afin de déterminer les Ki respectifs et le type d'inhibition : la RAPA est un inhibiteur compétitif alors que la CsA qui est un inhibiteur non compétitif de l'activité CYP27A1. L'association de ces deux immunosuppresseurs (situation des essais cliniques) aboutit à un effet inhibiteur additif sur l'activité CYP27A1. Cette inhibition de la production de 27-hydroxycholestérol, qui est un régulateur important de l'expression de l'HMG-CoA réductase, serait responsable d'une diminution du catabolisme du cholestérol mais aussi d'une augmentation de sa synthèse liée à **l'augmentation d'expression de l'HMGR**. L'activité CYP7B, la seconde enzyme importante de la voie acide du métabolisme des acides biliaires, est également inhibée par la CsA mais pas par la RAPA. Aucune différence significative n'a été observée concernant l'expression des CYP7A1 et CYP27A1 après traitement par la CsA ou la RAPA renforçant l'hypothèse d'une action spécifique sur l'activité enzymatique.

Ensuite, nous avons étudié l'effet des immunosuppresseurs sur le transport du cholestérol et des triglycérides par les lipoprotéines et plus particulièrement leur capture par des récepteurs spécifiques (LDL-R, SR-BI) qui reconnaissent certaines apolipoprotéines à la surface de ces lipoprotéines. Les traitements par la CsA et la RAPA diminuent de façon dose dépendante **l'expression du LDL-R** dans les cellules HepG2 et pourrait participer à l'augmentation de LDL-C observée chez les patients. Nous avons également montré que **ABCA1**, un transporteur ATP dépendant du cholestérol, responsable de l'efflux de cholestérol est induit en présence de CsA mais pas de RAPA. Dans le même temps **l'expression de LXRα**, un récepteur nucléaire responsable de l'activation de ABCA1, est augmentée en présence de CsA.
Enfin, nous avons mesuré la sécrétion des **apolipoprotéines AI, B, CIII et E**. La sécrétion d'apoB par les cellules HepG2, composant essentiel des LDL nécessaires pour leur reconnaissance par le LDL-R, est fortement affectée en présence de CsA. L'apoAI, l'apolipoprotéine majeure des HDL, est également légèrement diminuée en présence de RAPA et de CsA à de fortes concentrations (1 et 10μM). La sécrétion des apoE et CIII ne varie pas de façon significative dans notre modèle d'étude.

Nous avons donc mis en évidence une augmentation de synthèse, une augmentation d'efflux et une diminution d'entrée de cholestérol dans les hépatocytes sous l'influence des immunosuppresseurs. L'ensemble de ces variations explique l'augmentation de la concentration de cholestérol lors des traitements immunosuppresseurs. Si l'augmentation de synthèse est commune à la CsA et la RAPA, l'effet sur ABCA1 ne l'est pas. Les mécanismes de l'hypercholestérolémie ne sont donc pas totalement communs aux deux immunosuppresseurs testés. Concernant les apolipoprotéines, l'effet de la CsA et de la RAPA est également différent et expliquerait également l'augmentation de la concentration de cholestérol et de triglycérides du fait d'un défaut de leur transport.