

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES.....	14
PREFACE	18
INTRODUCTION.....	21
I. Le cholestérol : structure, distribution intracellulaire et origine	21
I. 1. Structure	21
I. 2. Distribution intracellulaire	21
I. 3. Origine.....	23
I. 3. a. La synthèse endogène.....	23
I. 3. b. Les apports exogènes	24
II. Le transport intracellulaire du cholestérol.....	27
II. 1. Du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique	28
II. 2. Vision globale du transport du cholestérol dérivé des LDL.....	29
II. 3. Les voies d'entrées du cholestérol dans la cellule.....	30
II. 3. a. L'endocytose par des voies dépendantes de la clathrine	31
L'endocytose par les récepteurs aux LDL	31
Les récepteurs scavengers : la voie de surcharge des macrophages	34
II. 3. b. L'endocytose par des voies indépendantes de la clathrine.....	36
II. 4. Le transport endosomal	37
II. 4. a. Etapes précoces du transport intracellulaire : endosomes précoces et endosomes de recyclage	38
II. 4. b. Conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs.....	39
II. 4. c. Transport rétrograde directement vers l'appareil de Golgi	40
II. 4. d. Endosomes tardifs et lysosomes.....	42
II. 5. La sortie du compartiment endosomal	43
II. 6. Le devenir du cholestérol après la sortie du compartiment endosomal	46
III. Les Rab GTPases, des acteurs privilégiés du transport vésiculaire	48
III. 1. Généralités	48
III. 1. a. Le cycle des Rab GTPases.....	48
III. 1. b. Localisation des Rab GTPases	50
III. 1. c. Protéines effectrices des Rab GTPases	51
III. 1. d. Rab GTPases et cholestérol	52
III. 2. Rab7.....	54
III. 2. a. Fusion endosomale.....	55

III. 2. b. Mobilité des endosomes tardifs	55
III. 2. c. Maturation endosomale	57
III. 2. d. Recrutement du complexe rétromère	58
III. 2. e. Pathologies associées aux mutations de Rab7	59
III. 3. Rab9	60
III. 4. Les SNARE, des effecteurs indispensables	60
IV. La régulation de l'homéostasie du cholestérol	64
IV. 1. Le complexe SREBP/SCAP	64
IV. 2. L'HMGCoA réductase	68
IV. 3. L'ACAT1 et l'hydrolase neutre des esters de cholestérol	68
IV. 4. Les oxystérols	69
IV. 5. Les facteurs nucléaires	69
IV. 5. a. Les liver X receptors (LXRs)	70
IV. 5. b. Les peroxisomeproliferator-activatedreceptors (PPARs)	71
V. Le stockage et l'efflux du cholestérol	72
V. 1. Le stockage	72
V. 2. L'efflux	73
V. 2. a. L'efflux médié par l'ABCA1	75
V. 2. b. L'efflux médié par l'ABCG1	76
OBJECTIFS DE LA THESE	80
RESULTATS EXPERIMENTAUX	83
I. Dynasore	83
I. 1. Article 1	85
I. 2. Résultats	86
I. 3. Discussion	88
II. Rab7 et Rab9	91
II. 1. Article 2	93
II. 2. Résultats	94
II. 3. Discussion et perspectives	96
III. Macrophages	101
III. 1. Résultats	102
III. 2. Discussion et perspectives	110
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	117
BIBLIOGRAPHIE	124

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation du cholestérol en structure plane	21
Figure 2 : La synthèse endogène du cholestérol	23
Figure 3 : Les étapes initiatrices de la formation de la plaque.....	26
Figure 4 : Les différents mécanismes de transport des lipides entre les membranes	28
Figure 5 : Transport du cholestérol néosynthétisé vers la membrane plasmique	29
Figure 6 : Le transport du cholestérol dérivé des LDL.....	30
Figure 7 : Structure de la clathrine.....	32
Figure 8 : Rôle de la dynamine dans l'endocytose dépendante de la clathrine	33
Figure 9 : Les récepteurs scavengers.....	35
Figure 10 : Le système endosomal.....	38
Figure 11 : La voie du transport rétrograde.....	41
Figure 12 : Rôle de NPC-1 et NPC-2 dans la sortie du cholestérol des MVB.....	44
Figure 13 : Les acteurs du trafic endolysosomal du cholestérol.....	46
Figure 14 : Le cycle d'activation des Rab GTPases.....	49
Figure 15 : Localisation des Rab	51
Figure 16 : Les différentes fonctions des Rab GTPases	52
Figure 17 : Le contrôle de la mobilité des endosomes tardifs	56
Figure 18 : Le « switch » Rab5/Rab7 pendant la maturation endosomale	58
Figure 19 : Le cycle des SNARE au cours du transport vésiculaire	62
Figure 20 : Mécanisme d'activation des SREBP.....	66
Figure 21 : Différents niveaux de régulation du métabolisme du cholestérol au niveau du réticulum endoplasmique.....	67
Figure 22 : Effets protecteurs de l'activation du complexe LXR/RXR par les oxystérols	71
Figure 23 : Organisation structurale d'une gouttelette lipidique.....	72
Figure 24 : Rôle d'ABCA1 et ABCG1 dans l'efflux du cholestérol des macrophages.....	75
Figure 25 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'étude sur le rôle de la dynamine dans le transport endolysosomal du cholestérol.....	87
Figure 26 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'étude sur le rôle de Rab7 dans le transport endosomal dans les cellules HeLa.....	95
Figure 27 : Validation de l'inhibition de Rab7 et Rab9 dans les HMDM	102
Figure 28 : Impact de l'inhibition de Rab7 et/ou Rab9 sur la distribution des LDLac et du cholestérol libre dans les HMDM	103
Figure 29 : Expression des gènes stérols-dépendants en fonction de l'inactivation de Rab7 et/ou Rab9 dans les HMDM.....	104

Figure 30 : Quantification des esters de cholestérol totaux en fonction de l'inactivation de Rab7 et/ou Rab9 dans les HMDM	105
Figure 31 : Evaluation de l'activité de l'ACAT en fonction de l'inactivation de Rab7 et/ou Rab9 dans les HMDM	106
Figure 32 : Impact de l'inhibition de Rab7 et/ou Rab9 sur l'efflux ABCA1-dépendant dans les HMDM.....	107
Figure 33 : Expression de l'ARNm d'ABCA1 en fonction de l'inactivation de Rab7 et/ou Rab9 dans les HMDM.....	108
Figure 34 : Expression de la protéine ABCA1 en fonction de l'inactivation de Rab7 et/ou Rab9 dans les HMDM	108
Figure 35 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'étude sur le rôle de Rab7 dans le transport du cholestérol dans les HMDM	109

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

ABC	ATP binding cassette
ABCA1	ATP binding cassette transporter A1
ABCG1	ATP binding cassette transporter G1
ACAT	Acyl Coenzyme A:cholestérol acyl transférase
aCEH	Acid cholesterol ester hydrolase
apo	Apolipoprotéine
ARNm	ARN messagers
ATP	Adénosine triphosphate
BMP	Bismonoacylglycérophosphate
CCP	Clathrin-coated pit
Cla-1	CD36 and limp-II analogous 1
CLHP	Chromatographie liquide haute pression
CORVET	Class C core vacuole-endosome transport
CM	Chylomicron
CMT2B	Charcot-Marie-Tooth type 2B
COPII	Coatprotein II
EC	Esters de cholestérol
EE	Early endosome
EGF	Epidermal growth factor
EGF-R	EGF receptor
ERC	Endosomal recycling compartment
ESCRT	Endosome-associated complex required for transport
GAP	GTPase activating protein
GDF	GDI displacement factor
GDP	Guanine diphosphate
GDI	GDP dissociation inhibitor
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanine triphosphate
HDL	High density lipoprotein

HMDM	Human monocyte-derived macrophages
HMGCoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A
HMGCoAR	HMGCoA réductase
HOPS	Homotypic fusion and protein sorting complex
IDL	Intermediate density lipoprotein
IFNAR1	Interferon α receptor 1
ILV	Intraluminal vesicles
INSIG	Insulin induced gene
KO	Knock-out
LAL	Lysosomal acid lipase
LBPA	Lysobisphosphatidic acid
LDL	Low density lipoprotein
LDLac	LDL acétylées
LDL-R	LDL receptor
LE	Late endosome
LOX-1	Lectin-like oxidized LDL receptor
LPDS	Lipoprotein deficient serum
LXR	Liver X receptor
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MPR	Mannose-6-phosphate receptor
MVB	Mutivesicular bodies
MLN64	Metastatic lymph node 64
nCEH	Neutral cholesterol ester hydrolase
NPC	Niemann-Pick type C
NSF	N-ethylmaeimide sensitive factor
ORP	OSBP-related protein
ORP1L	Oxysterol related protein 1 L
OSBP	Oxysterol-binding protein
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PI	Phosphatidylinositol

PPAR Peroxisome proliferator-activated receptor
 PPRE Peroxisome proliferators response element

Rab Ras-related protein in brain
 RabGGT Rab géranylgéranyl transférase
 RE Réticulum endoplasmique
 REP Rab escort protein
 RILP Rab interacting lysosomal protein
 RPE1 Retinal pigmental epithelium cells
 RT-PCR Real time PCR
 RXR Retinoid X receptor

SCAP SREBP-cleavage activating protein
 siRNA Small interfering RNA
 SNAP soluble NSF attachment protein
 SNARE SNAP receptor
 Snx Sorting nexin
 SR-A Scavenger receptor class A
 SR-B Scavenger receptor class B
 SRE Sterol response element
 SREBP Sterol regulatory element binding protein
 SSD Sterol sensing domain
 StAR steroidogenic acute regulatory protein
 START StAR-related lipid transfer
 STX Syntaxine
 STxB Shiga toxin B-subunit

Tfn Transferrine
 TGN *Trans*-Golgi Network
 TIC Transport inverse du cholestérol
 TIP47 47-kDa tail interacting protein
 TLR4 Toll-like receptor 4

VAMP Vesicle-associated membrane protein
 VLDL Very low density lipoprotein
 Vps Vacuolar protein sorting

PREFACE

Le cholestérol joue un rôle unique parmi les nombreux lipides cellulaires. Il est un élément essentiel au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules. Cela repose sur ses propriétés biophysiques qui lui permettent de réguler l'organisation et la fluidité des bicouches lipidiques. Le cholestérol agit aussi sur les protéines enchâssées dans la membrane et contrôle ainsi le transport membranaire et la signalisation intracellulaire. Les métabolites du cholestérol, les stéroïdes et les acides biliaires, ont eux aussi des rôles physiologiques importants.

Le cholestérol est continuellement redistribué au sein de l'organisme en fonction des besoins cellulaires. A l'échelle de chaque cellule, l'homéostasie du cholestérol repose sur l'équilibre entre son entrée, sa sortie et sa synthèse endogène. Les concentrations et la distribution intracellulaires en cholestérol sont très finement régulées car, même si le cholestérol est indispensable à la survie des cellules, un excès est toxique. L'accumulation de cholestérol que ce soit dans la circulation sanguine ou la cellule entraîne des effets délétères et conduit au développement de pathologies telles que l'athérosclérose ou les maladies de surcharge. Au niveau cellulaire, le cholestérol est un élément très dynamique. Il existe différentes voies de transport du cholestérol ce qui rend difficile son étude. Les mécanismes qui permettent le transport entre les organelles sont de mieux en mieux décrits mais leur régulation reste encore mal comprise.

La première partie de ce manuscrit présente une vue d'ensemble des connaissances actuelles sur le cholestérol, son transport et sa régulation dans la cellule. Le but de cette introduction n'est pas d'établir un inventaire exhaustif de toutes les connaissances acquises dans le domaine mais plutôt d'en dégager les grands principes afin de mieux appréhender le contexte de nos recherches. Les aspects plus spécifiques du transport du cholestérol dans les macrophages seront aussi développés dans cette introduction.

Dans une seconde partie, les travaux réalisés durant cette thèse seront exposés sous la forme de deux articles de recherche, le premier étant déjà publié dans PLoS ONE et le deuxième en préparation, ainsi que de résultats complémentaires obtenus dans les macrophages. Enfin, les résultats obtenus seront discutés dans leur globalité dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Le cholestérol : structure, distribution intracellulaire et origine

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols. Son nom dérive du grec *chole-* (bile) et de *stereos* (solide), car il fut découvert sous forme solide dans les calculs biliaires en 1758 par François Poulletier de La Salle.

I. 1. Structure

La molécule de cholestérol est une molécule amphiphile : elle est formée d'une tête hydrophile et d'un corps hydrophobe. Cependant, le corps de la molécule, constitué d'un noyau cyclo-pentano-phénanthrénique, est prédominant et confère au cholestérol une nature hydrophobe. Le noyau correspond à quatre cycles carbonés noté A, B, C et D (Figure 1). La tête polaire est limitée à un groupement hydroxyle sur le carbone 3 (C3). Cette fonction peut être estérifiée par un acide gras ce qui rend la molécule totalement insoluble dans l'eau. Malgré la présence de 8 carbones asymétriques, un seul stéréo-isomère est présent naturellement : le 3 β -ol lévogyre.

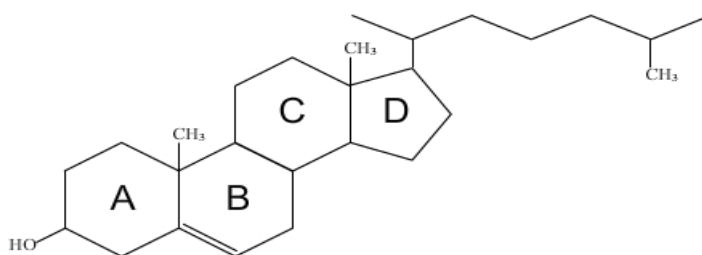


Figure 1 : Représentation du cholestérol en structure plane

(<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/cholesterol/cholesterol.html>)

I. 2. Distribution intracellulaire

Le cholestérol étant une molécule fortement hydrophobe, il est presque exclusivement présent dans la cellule sous forme libre au sein des membranes ou bien sous forme d'esters dans les gouttelettes lipidiques. Le fait que le cholestérol libre cytoplasmique

soit toxique explique aussi cette répartition (Tabas, 2002). Les deux pools de cholestérol (libre et estérifié) sont en équilibre.

Au niveau des différentes membranes cellulaires, le cholestérol n'est pas réparti de façon égale. La majorité du cholestérol est localisée dans la membrane plasmique. Selon les études et selon le type cellulaire étudié, la proportion de cholestérol estimée à la membrane plasmique varie de 40 à 90% du cholestérol cellulaire total (Liscum and Munn, 1999). Les différentes techniques permettant d'évaluer la concentration de cholestérol à la membrane plasmique sont :

- le fractionnement subcellulaire couplé au dosage du cholestérol,
- l'extraction du cholestérol de la membrane plasmique par la méthyl-beta-cyclodextrine couplée au dosage du cholestérol,
- et le dosage du cholestérol membranaire oxydé (cholesténone) par la cholestérol oxydase (Lange, 1992).

Au niveau du réticulum endoplasmique (RE), la concentration en cholestérol est très basse et ne représente pas plus de 0,5 à 1 % du cholestérol cellulaire (Lange et al., 1999). Ce gradient de cholestérol entre la membrane plasmique et le RE est indispensable pour assurer une régulation fine de l'homéostasie cellulaire du cholestérol, mais aussi pour de nombreuses fonctions cellulaires.

Le cholestérol est aussi réparti de façon hétérogène dans le système endocytaire. On trouve une quantité importante de cholestérol dans le compartiment de recyclage (ERC, endosomal recycling compartment) alors que des concentrations plus faibles sont retrouvées dans les endosomes et les lysosomes (Maxfield and Wustner, 2002). Cette différence peut être expliquée par le fait que le cholestérol a une plus grande affinité pour les membranes riches en sphingolipides et en phospholipides saturés, comme celles de l'ERC (Mesmin and Maxfield, 2009).

Malgré sa capacité à diffuser au sein des bicouches lipidiques (latéralement ou entre les feuillettes grâce à des flipases), le cholestérol n'est pas distribué de façon homogène au sein de la membrane plasmique (Mesmin and Maxfield, 2009). Il est réparti de façon asymétrique de part et d'autre de la bicouche permettant ainsi la génération de la courbure membranaire. Il existe également des hétérogénéités de répartition du cholestérol au sein d'un même feuillet. Le cholestérol et certains phospholipides s'associent préférentiellement entre eux au niveau de nanodomains de la membrane appelés raft ou au niveau d'invaginations appelées cavéoles. Ces structures dynamiques enrichies en cholestérol seront décrites plus amplement dans le chapitre II. 3. b.

I. 3. Origine

Le cholestérol cellulaire a deux origines : l'apport exogène *via* les lipoprotéines et la synthèse endogène. Les besoins cellulaires en cholestérol sont majoritairement assurés par les apports endogènes (environ 75%), la différence étant couverte par les apports exogènes.

I. 3. a. La synthèse endogène

Toute cellule nucléée de l'organisme peut synthétiser du cholestérol (Dietschy et al., 1993). La synthèse débute dans le cytoplasme des cellules et nécessite environ une quarantaine d'étapes. De nombreuses enzymes sont impliquées mais 4 phases principales peuvent être distinguées :

- la condensation de 3 molécules d'acétylCoA en hydroxy-méthyl-glutarate, puis la réduction en mévalonate,
- l'activation du mévalonate en isoprène par décarboxylation,
- la condensation de 6 molécules d'isoprène en squalène,
- la cyclisation du squalène en lanostérol puis la transformation en cholestérol.

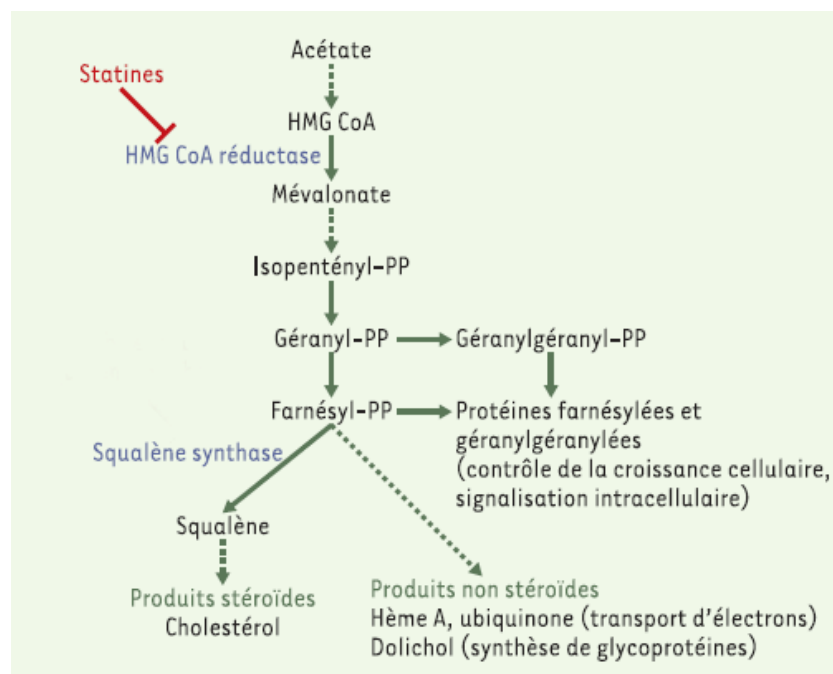


Figure 2 : La synthèse endogène du cholestérol

HMGCoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A; PP, pyrophosphate. D'après (Morozova et al., 2005).

L'étape limitante de la synthèse endogène du cholestérol est la conversion de l'HMGC_oA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A) en mévalonate par l'HMGC_oA réductase (HMGC_oAR). Cette enzyme est une protéine résidante du RE. Elle contient un domaine catalytique et un domaine SSD (sterol sensing domain) qui lui permet d'être régulée par les concentrations de stérol présentes dans la membrane du RE (Brown and Goldstein, 1999). La dégradation de la protéine est régulée par les produits finaux du métabolisme du mévalonate (détaillée dans le chapitre IV. 2.). Comme indiqué dans la figure 2, les statines sont des inhibiteurs pharmacologiques de l'HMGC_oAR. Cette propriété leur permet d'inhiber la synthèse endogène du cholestérol et d'être utilisées dans le traitement de l'hypercholestérolémie.

I. 3. b. Les apports exogènes

Bien que les cellules soient capables de synthétiser le cholestérol dont elles ont besoin, il existe des mécanismes parallèles de capture du cholestérol présent dans le milieu extérieur. Ces voies, représentées par le métabolisme des lipoprotéines, permettent aux cellules d'épargner le coût énergétique de sa synthèse.

Les lipoprotéines sont des particules sphériques de taille et de composition variables dont le rôle est d'assurer le transport des lipides dans la circulation sanguine. Elles sont toutes composées d'un cœur lipidique, contenant des esters de cholestérol (EC) et des triglycérides, entouré d'une enveloppe amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (apo) (Lagrot et al., 2005).

Les lipoprotéines sont caractérisées par l'apo majoritaire qui les compose ainsi que par leur densité (rapport protéines/lipides). Elles sont classifiées selon leur taille, leur densité et leur charge. Ainsi, on distingue des moins denses au plus denses :

- les chylomicrons (CM),
- les lipoprotéines de très basse densité (VLDL, very low density lipoproteins),
- les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, intermediate density lipoproteins),
- les lipoprotéines de basse densité (LDL, low density lipoproteins),
- et les lipoprotéines de haute densité (HDL, high density lipoproteins).

Les CM sont formés dans les entérocytes à partir des lipides alimentaires. Ils apportent les lipides exogènes jusqu'au foie. A partir des CM, le foie synthétise des lipoprotéines de plus petite densité, les VLDL qu'il libère dans la circulation sanguine. Le catabolisme des VLDL

dans la circulation aboutit à la formation des IDL et des LDL. Ce sont ces lipoprotéines qui apportent le cholestérol, qu'il soit endogène ou d'origine alimentaire, jusqu'aux tissus périphériques. En échange, lorsque les cellules périphériques ont du cholestérol en excès, elles peuvent le céder aux HDL qui l'acheminent jusqu'au foie, seul organe capable d'éliminer le cholestérol et aux tissus stéroïdogènes. Cette étape est appelée le transport inverse du cholestérol (TIC).

Les LDL sont les lipoprotéines principales transportant le cholestérol vers tous les tissus périphériques. Elles sont composées majoritairement de EC et d'apo B (Lagrot et al., 2005). Leur capture se fait grâce aux récepteurs des LDL (LDL-R, LDL receptor) présents à la surface de toutes les cellules nucléées. Les cellules internalisent les LDL liées à leurs récepteurs par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Brown and Goldstein, 1979). Cette voie sera plus largement développée dans la partie II. 2. du manuscrit.

Lorsque les concentrations de LDL circulantes sont élevées, celles-ci peuvent passer dans l'espace sous-endothélial. Ce phénomène est plus particulièrement localisé au niveau des courbures et des bifurcations des artères de gros calibre où le flux sanguin est perturbé. Ces LDL sont alors modifiées, principalement par oxydation et internalisées par les macrophages dont le rôle est de limiter localement l'accumulation des lipoprotéines pro-athérogènes (Figure 3). Les LDL oxydées activent les cellules endothéliales et provoquent le recrutement de monocytes circulants, qui se transforment en macrophages dans l'espace sous-endothélial.

Lorsque la quantité de LDL modifiées dans cet espace augmente, les macrophages forment de très nombreuses gouttelettes lipidiques et se transforment ainsi en cellules spumeuses ou « foam cells » qui donnent les stries lipidiques. C'est la première étape de la formation de la plaque d'athérosclérose.

Le phénomène inflammatoire s'amplifie avec le recrutement d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et cellules immunitaires) et évolue vers un état chronique. Ces premières étapes de progression de la plaque sont généralement silencieuses. Cependant, la croissance de la plaque peut conduire à la diminution et à l'obstruction de la lumière artérielle ou à sa rupture entraînant la formation d'un thrombus (Moore and Tabas, 2011). La survenue de complications aiguës est le processus physiologique majeur pouvant rendre une plaque brutalement symptomatique. Ainsi, l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral ou la mort subite coronaire sont des manifestations cliniques liées à l'athérosclérose compliquée.

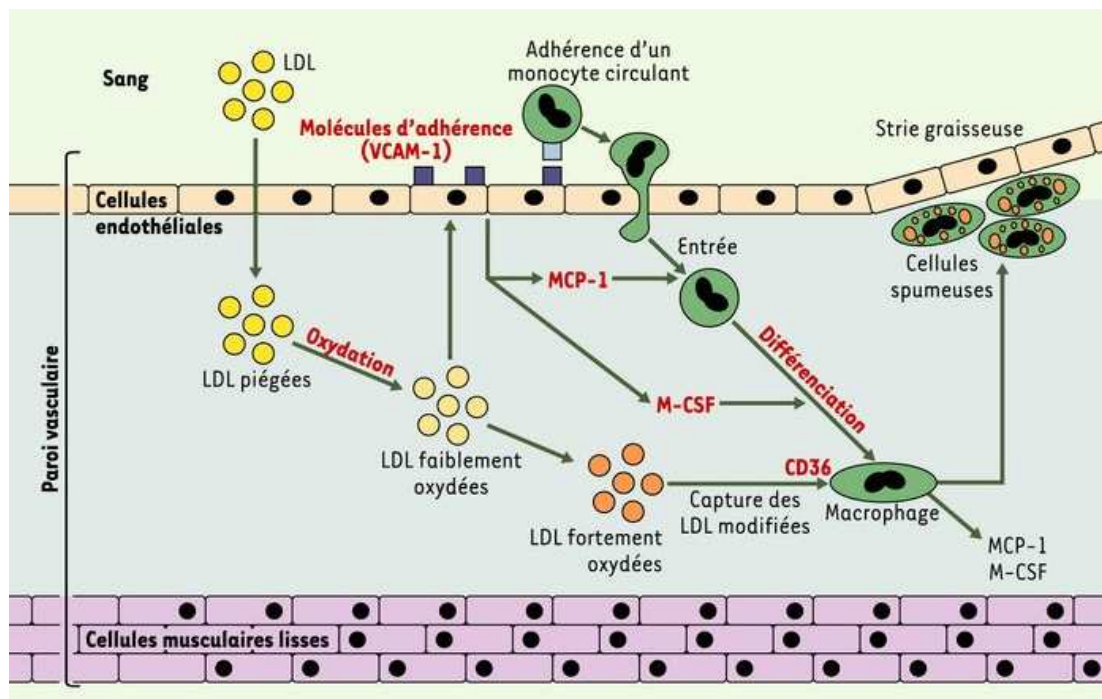


Figure 3 : Les étapes initiatrices de la formation de la plaque

Les LDL (low density lipoprotein) circulantes pénètrent dans la paroi vasculaire et résident dans l'espace sous-endothélial. Elles y subissent des modifications. L'oxydation des LDL provoque le recrutement des monocytes circulants *via* l'expression de facteurs d'adhésion à la surface des vaisseaux. Les monocytes se différencient en macrophages et captent les LDL oxydées. Ils se transforment alors en cellules spumeuses. M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MCP-1, monocyte chemotactic protein 1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1. D'après (Morozova et al., 2005).

II. Le transport intracellulaire du cholestérol

Le transport intracellulaire du cholestérol et sa distribution correcte au niveau des différentes membranes sont essentiels pour le maintien du gradient de cholestérol.

Les différentes voies de transport du cholestérol et plus encore les mécanismes contrôlant leurs régulations restent encore mal connus. La difficulté résulte des interconnexions entre les différents pools intracellulaires de cholestérol ainsi que de la variabilité des mécanismes qui peuvent opérer simultanément pour leur transport.

Plusieurs études ont néanmoins démontré le rôle concomitant de deux processus : le transport vésiculaire et le transport non vésiculaire. Dans les deux cas, le cholestérol est pris en charge par des transporteurs car il ne peut diffuser librement dans le cytoplasme.

Le transport vésiculaire du cholestérol reste le processus le plus étudié. Ce mode de transport permet de véhiculer le cholestérol au sein de vésicules et nécessite l'intégrité du cytosquelette le long duquel les vésicules se déplacent grâce à des moteurs moléculaires et de l'énergie fournie par l'ATP (adénosine triphosphate) (Mesmin and Maxfield, 2009). Le transport vésiculaire participe aux voies d'endocytose mais aussi aux voies de sécrétion.

Concernant le transport non vésiculaire, il s'agit d'un transfert direct de cholestérol entre deux membranes proches ou en contact (Figure 4). Pour permettre ce transport, le cholestérol est pris en charge par des protéines transporteuses des stérols.

Il existe deux grandes familles de protéines transporteuses diffusibles :

- les ORP (OSBP related proteins) qui regroupent l'OSBP (oxysterol-binding protein) et ses apparentées,
- et les protéines de la famille START (StAR-related lipid transfer).

Chez l'Homme, il existe 12 protéines appartenant à la famille des protéines ORP (Lehto et al., 2001). Ces protéines ont comme point commun de pouvoir lier les oxystérols et d'ainsi pouvoir les transporter au sein du cytoplasme. Leur rôle est de contrôler l'adressage aux différents compartiments cibles (Olkonen, 2004).

Les protéines de la famille START, une quinzaine décrite chez l'Homme, ont en commun de posséder un domaine START qui lie les lipides mais ont des localisations intracellulaires différentes. Elles participent au transport et au métabolisme des lipides (Alpy and Tomasetto, 2005). Parmi les membres de cette famille, on peut citer la protéine StAR (steroidogenic

acute regulatory) qui permet le passage du cholestérol des membranes externes aux membranes internes des mitochondries.

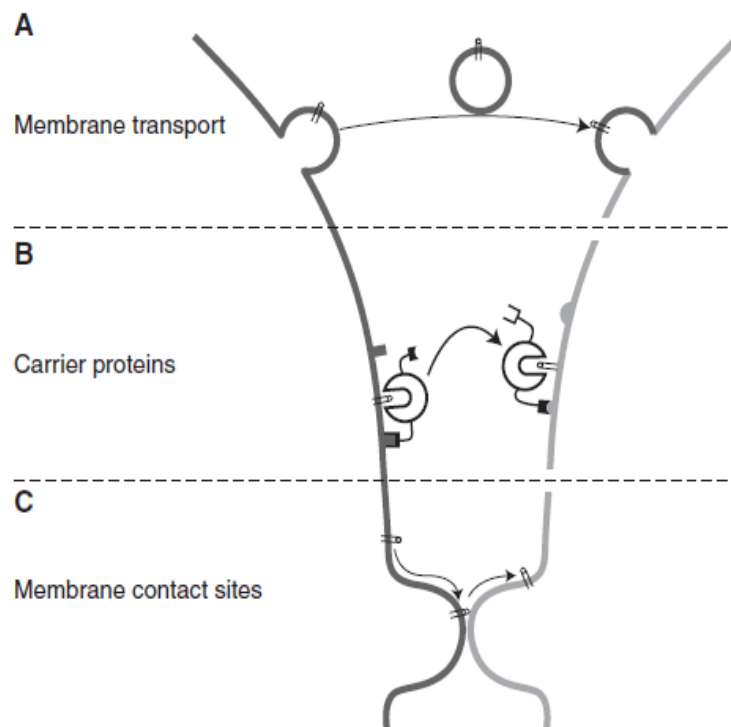


Figure 4 : Les différents mécanismes de transport des lipides entre les membranes

A. Transport vésiculaire des lipides et des protéines membranaires à longue distance le long du cytosquelette. B. Transport sélectif par des protéines transporteuses contenant une poche hydrophobe. C. Echange de lipides entre deux membranes très proches. D'après (Blom et al., 2011).

II. 1. Du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique

Les étapes finales de la synthèse endogène du cholestérol se déroulent dans le RE. Afin d'y maintenir des concentrations basses, le cholestérol néosynthétisé doit rapidement quitter les membranes de ce compartiment.

Une partie importante du cholestérol néosynthétisé rejoint directement la membrane plasmique (Figure 5). Le fait que la dissociation du cytosquelette n'a pas d'impact sur l'arrivée du cholestérol à la membrane montre que cette voie est non vésiculaire (Kaplan and Simoni, 1985). L'autre fraction, minoritaire, transite jusqu'au Golgi via une voie vésiculaire (Heino et al., 2000). Une fois au Golgi, le cholestérol rejoint la membrane plasmique *via* la voie de sécrétion.

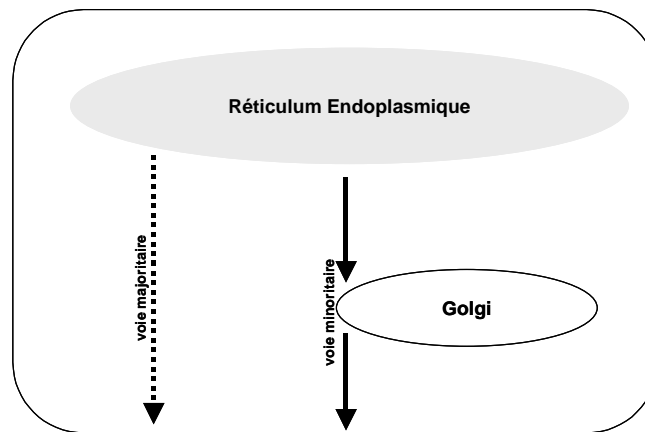


Figure 5 : Transport du cholestérol néosynthétisé vers la membrane plasmique

Les flèches pleines représentent les transports vésiculaires et les flèches en pointillés les transports non vésiculaires. Le cholestérol néosynthétisé est transporté du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique par une voie directe non vésiculaire majoritaire. Une voie vésiculaire minoritaire passe par le Golgi. D'après (Soccio and Breslow, 2004).

En complément des deux voies décrites ci-dessus, il existe des sites de contact entre la membrane plasmique et le RE où pourraient avoir lieu des échanges directs entre les deux compartiments (Toulmay and Prinz, 2011). Il a aussi été mis en évidence un rôle de la cavéoline dans le mouvement non vésiculaire du cholestérol vers la membrane plasmique (Smart et al., 1996).

Le cholestérol est ensuite rapidement distribué aux différentes membranes internes et subit des cycles continus de transport entre la membrane plasmique et les compartiments intracellulaires.

II. 2. Vision globale du transport du cholestérol dérivé des LDL

La figure 6 présente schématiquement le transport intracellulaire des LDL après leur entrée par l'intermédiaire du LDL-R ainsi que le devenir du cholestérol dérivé des LDL. Il met en évidence la coexistence de voies vésiculaires et non vésiculaires. Toutes les étapes de ce transport sont détaillées une à une dans les paragraphes suivants.

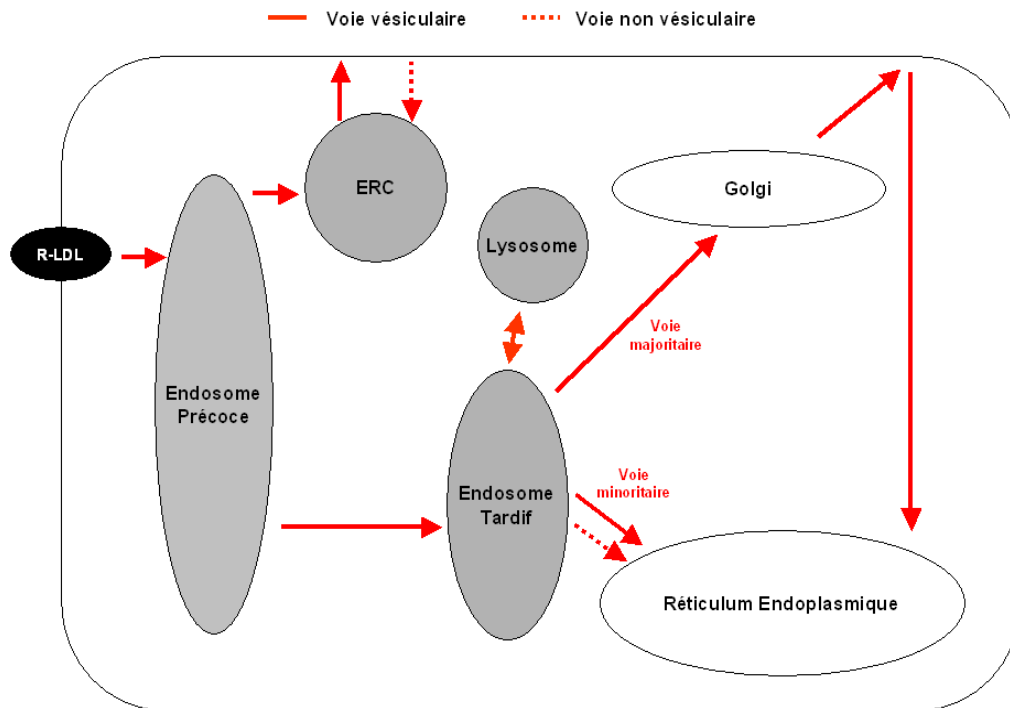


Figure 6 : Le transport du cholestérol dérivé des LDL

Les flèches pleines représentent les transports vésiculaires et les flèches en pointillés les transports non vésiculaires. ERC, endosomal recycling compartment; R-LDL, LDL receptor. D'après (Soccio and Breslow, 2004).

Les LDL et leur récepteur sont internalisés et transportés dans l'endosome précoce (EE, early endosome). Le LDL-R se détache des LDL et est recyclé à la membrane plasmique par une voie vésiculaire *via* l'ERC. Le transport des LDL de l'EE à l'endosome tardif (LE, late endosome) se fait par voie vésiculaire directe. La plupart du cholestérol contenu dans le LE est transportée vers le RE par une voie vésiculaire impliquant le Golgi et la membrane plasmique. Il existe également une voie directe, minoritaire, du LE vers le RE et qui peut être vésiculaire ou non vésiculaire.

II. 3. Les voies d'entrées du cholestérol dans la cellule

L'entrée du cholestérol dans la cellule se fait par endocytose. L'endocytose est un mécanisme cellulaire complexe qui permet l'entrée du matériel extracellulaire ou membranaire grâce à la déformation de la membrane cellulaire. C'est un processus essentiel assurant non seulement l'internalisation de nutriments nécessaires à la survie cellulaire mais

aussi la régulation des systèmes de signalisation. L'endocytose du cholestérol utilise différentes voies, certaines sont dépendantes de récepteurs, d'autres sont moins spécifiques.

II. 3. a. L'endocytose par des voies dépendantes de la clathrine

L'endocytose par les récepteurs aux LDL

Habituellement, la capture du cholestérol exogène par la cellule implique l'endocytose de LDL riches en EC par l'intermédiaire du LDL-R. Ce processus a été mis en évidence pour la première fois par l'équipe de M.S. Brown et J.L. Goldstein (prix Nobel de médecine en 1985) et représente le paradigme de l'endocytose des récepteurs par les puits recouverts de clathrine (Brown and Goldstein, 1979). Bien que le transport des LDL soit bien décrit il reste encore des questions sur le devenir du cholestérol après son endocytose.

Le LDL-R est exprimé de façon ubiquitaire. Il comporte une partie membranaire, une partie extracellulaire permettant la reconnaissance et la liaison aux LDL, ainsi qu'une partie cytoplasmique contenant la séquence d'interaction avec la clathrine (Hussain et al., 1999).

Les LDL se fixent à leurs récepteurs localisés au niveau de puits recouverts de clathrine (CCP, clathrin-coated pits) (Figure 7). L'unité fonctionnelle de la clathrine est un triskelion composé de 3 sous-unités comprenant chacune une chaîne lourde et une chaîne légère de la clathrine (McMahon and Boucrot, 2011). C'est l'association de plusieurs triskelions sous la membrane intracellulaire qui forme le manteau de clathrine. Celui-ci permet l'invagination de la membrane plasmique. La clathrine joue donc un rôle primordial dans l'internalisation des récepteurs et de leurs cargos.

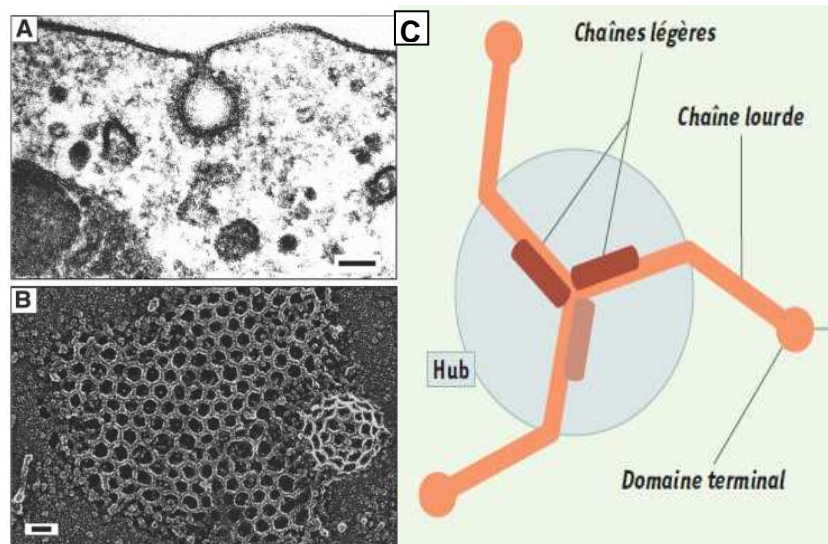


Figure 7 : Structure de la clathrine

A-B. Observation en microscopie électronique de manteaux de clathrine sur des invaginations membranaires d'après (Marsh and McMahon, 1999). C. Représentation structurale d'un triskélion de clathrine. D'après (Benmerah and Lamaze, 2002).

Une étude réalisée par notre équipe a cependant montré que le blocage des voies dépendantes de la clathrine par expression d'un mutant dominant négatif ou par ARN interférence, n'a pas empêché la pénétration des LDL dans la cellule (Robinet et al., 2006). Cela implique que les voies d'endocytose dépendantes de la clathrine ne sont pas les seules impliquées dans le transport intracellulaire des LDL. Une de nos hypothèses est que lorsque l'endocytose dépendante de la clathrine n'est plus fonctionnelle, l'endocytose des LDL pourrait faire intervenir d'autres voies d'endocytose impliquant les cavéoles ou des voies non vésiculaires.

Les structures invaginées formées subissent l'action de la dynamine pour se détacher de la membrane afin de donner des vésicules d'endocytose clathrinées. La dynamine est une mécano-enzyme de type GTPase indispensable aux événements de fission membranaire aboutissant à la formation d'une vésicule (McMahon and Boucrot, 2011).

Plusieurs molécules de dynamine sont recrutées au niveau du col de l'invagination. Elles forment un polymère de structure hélicoïdale qui se comprime après hydrolyse du GTP et détache la vésicule en formation (Figure 8). Le rôle de la dynamine a d'abord été mis en évidence au niveau des puits de clathrine (Schmid et al., 1998) et plus récemment au niveau de plusieurs voies vésiculaires au sein de la cellule (Ferguson and De Camilli, 2012). Une fois formées, les vésicules perdent leur manteau de clathrine et fusionnent avec les EE.

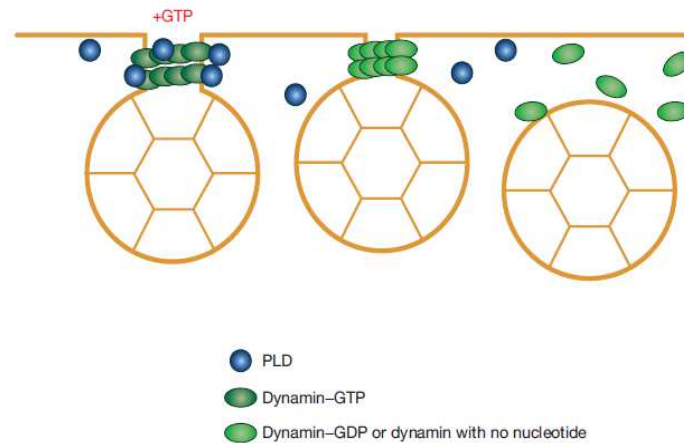


Figure 8 : Rôle la dynamine dans l'endocytose dépendante de la clathrine

La dynamine est recrutée au niveau du col de l'invagination couverte de clathrine où son activité GTPasique permet la constriction des membranes et la libération d'une vésicule clathrinée. La phospholipase D (PLD) catalyse l'hydrolyse du GTP (guanine triphosphate). GDP, guanine diphosphate. D'après (Hinshaw, 2006).

M. S. Brown et J. L. Goldstein ont montré que l'endocytose des LDL *via* leurs récepteurs était une voie très finement régulée par les concentrations intracellulaires en cholestérol (Brown and Goldstein, 1979). Le mécanisme de cette régulation sera détaillé dans le chapitre IV. 1.

C'est en étudiant des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale que M. S. Brown et J.L. Goldstein ont mis en évidence la structure du LDL-R, la voie d'endocytose qu'il emprunte ainsi que la régulation du métabolisme du cholestérol (Goldstein and Brown, 1984). Ils ont décrit différents types de mutations du LDL-R provoquant une hypercholestérolémie :

- les mutations bloquant sa synthèse,
- les mutations empêchant son adressage à la membrane plasmique,
- les mutations réduisant ou inhibant sa liaison aux LDL,
- et les mutations pour lesquelles le LDL-R ne peut plus être internalisé.

Ces mutations entraînent une augmentation des concentrations plasmatiques de cholestérol, en général due au déficit d'endocytose des LDL dans les hépatocytes, et augmentent le risque de survenue de maladies cardio-vasculaires (Maxfield and van Meer, 2010).

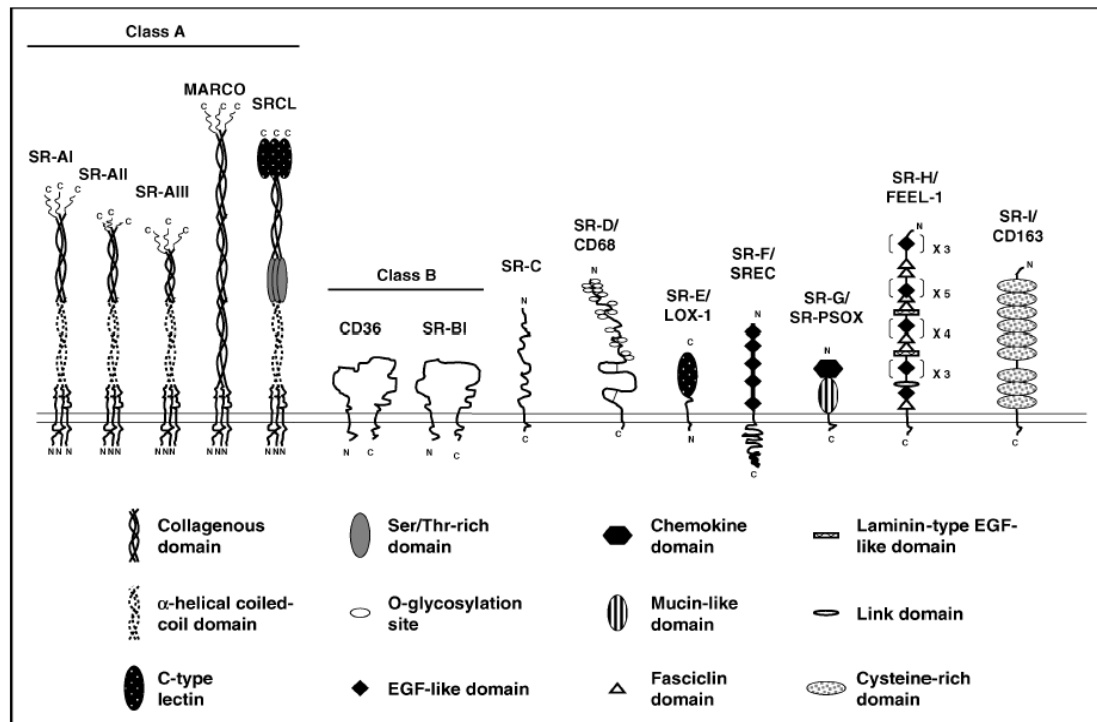
D'autres mutations ont été décrites comme impliquées dans l'hypercholestérolémie familiale. Elles touchent l'apo B et PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9). Dans le cas

des mutations de l'apo B, la capacité de liaison de la lipoprotéine avec le LDL-R est réduite ce qui entraîne une diminution de l'endocytose des LDL (Mahley et al., 1991). PCSK9 a été identifiée récemment grâce aux screening génétiques et contrôle le devenir des LDL-R en favorisant leur dégradation plutôt que leur recyclage. Cependant, son mécanisme d'action reste encore mal connu (Maxfield and van Meer, 2010). Une mutation gain de fonction de PCSK9 cause une hypercholestérolémie alors qu'une mutation inactivatrice provoque l'effet inverse. Cela montre le rôle majeur de cette protéine dans la régulation du métabolisme des LDL.

Les récepteurs scavengers : la voie de surcharge des macrophages

Dans les macrophages, les LDL-R ainsi que les récepteurs aux VLDL sont présents à la membrane plasmique mais les récepteurs majoritaires sont les récepteurs scavengers (éboueurs). Ces récepteurs sont d'autant plus exprimés qu'ils ne sont pas régulés par le contenu intracellulaire en cholestérol. Grâce à leur capacité à se lier à l'apo B modifiée, les récepteurs scavengers sont les seuls capables d'internaliser les LDL modifiées présentes dans l'espace sous-endothélial. La voie d'endocytose suivie par les LDL modifiées est proche de celle des LDL internalisées *via* les LDL-R mais transite par des endosomes distincts (Wang et al., 2007).

Il existe plusieurs types de récepteurs scavengers (Figure 9). Ils possèdent une grande diversité de ligands : lipoprotéines, complexes pathogènes, cellules apoptotiques...



MARCO, macrophage receptor with collagenous structure; SRCL, scavenger receptor C-type lectin; LOX-1, lectin-like oxidized LDL receptor 1; SREC, SR expressed by endothelial cell; PSOX, phosphatidylserine and oxidized lipoprotein; EGF, epidermal-like growth factor. FEEL is fasciclin, epidermal growth factor (EGF)-like, laminin-type EGF-like, link domain-containing scavenger receptor. Source: Based on a proposal by Krieger [1].

Figure 9 : Les récepteurs scavengers

D'après (van Berkel et al., 2005).

Les récepteurs scavengers de classe A type I et type II (SR-AI et SR-AII) ont pour ligands préférentiels les LDL acétylées et les LDL oxydées ce qui leur confère un rôle pro-athérogène. Ils sont exprimés de façon très importante dans les macrophages. Grâce à des souris knock-out (KO), il a pu être montré qu'ils participent à hauteur de 30% à l'endocytose des LDL oxydées et à hauteur de 80% pour les LDL acétylées (Dhaliwal and Steinbrecher, 1999). Ces résultats montrent que ces récepteurs jouent un rôle primordial dans la formation des cellules spumeuses.

Les récepteurs CD36 (qui appartiennent à la famille de récepteurs de type SR-B) sont spécialisés dans l'élimination des LDL partiellement oxydées. Avec les SR-AI et les SR-AII, ils sont responsables de l'élimination de 75 à 90 % des LDL modifiées présentes dans l'espace sous-endothélial (Pennings et al., 2006).

Les récepteurs CD68 sont capables d'endocyter des LDL oxydées (Dhaliwal and Steinbrecher, 1999). Leur rôle reste cependant mal défini par absence de souris KO pour le gène codant pour ce récepteur.

Les récepteurs Cla-1 (CD36 and limp-II analogous 1) sont les homologues humains des récepteurs scavengers de classe B type I murins (SR-BI). Ils sont impliqués dans le transport bidirectionnel du cholestérol entre la cellule et les HDL mais aussi dans l'internalisation des LDL acétylées et oxydées (Pennings et al., 2006). Le rôle majeur de ces récepteurs est l'entrée du cholestérol dans les tissus stéroïdogènes et le foie pour l'excrétion biliaire. Au niveau des macrophages, le rôle de Cla-1 peut être soit pro-athérogène, soit anti-athérogène. Les récepteurs LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor) appartiennent à la classe E des récepteurs scavengers. Ils sont principalement exprimés à la surface des cellules endothéliales et plus encore dans les zones de formation des plaques d'athérome.

Par leur nature et leurs caractéristiques, les récepteurs scavengers sont considérés comme pro-athérogènes car ils sont responsables de l'entrée incontrôlée de LDL modifiées entraînant la transformation des macrophages en cellules spumeuses (de Winther and Hofker, 2000; Moore and Freeman, 2006).

II. 3. b. L'endocytose par des voies indépendantes de la clathrine

En parallèle de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, il existe d'autres voies qui peuvent intervenir pour permettre l'endocytose à partir de la membrane plasmique (Doherty and McMahon, 2009; Gonnord et al., 2012).

Les cavéoles sont des structures invaginées non recouvertes de clathrine riches en cholestérol et en sphingolipides présentes à la membrane plasmique. Elles sont formées grâce à des protéines structurales : les cavéolines (Parton and Simons, 2007). Elles présentent une forme d'oméga inversé observable par microscopie électronique. Ce sont des structures très dynamiques. Leur rôle est encore mal compris mais il a été mis en évidence qu'elles participaient à de nombreuses voies de signalisation et d'endocytose. Les cavéoles peuvent permettre le transport du cholestérol depuis la membrane plasmique vers les accepteurs extracellulaires, d'une part, ou les compartiments intracellulaires, d'autre part (Fielding and Fielding, 2001). Notre équipe a de plus montré que les cavéoles possèdent un rôle mécanosenseur qui permet aux cellules de s'adapter rapidement aux variations de pression dans l'environnement cellulaire (Nassoy and Lamaze, 2012; Sinha et al., 2011).

Les rafts sont des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et sphingolipides localisés dans la membrane plasmique. Ils ont d'abord été caractérisés par le fait qu'ils étaient insolubles dans les détergents anioniques. Ils sont très dynamiques mais pourraient

être stabilisés par des interactions avec les protéines membranaires. Ils agiraient alors comme une plateforme qui coordonne et favorise la transduction des signaux cellulaires (Lingwood and Simons, 2010).

L'endocytose des cavéoles et des rafts a longtemps été sujet à controverse. Même s'il est aujourd'hui reconnu que les cavéoles et les rafts peuvent être internalisés par des voies dépendantes de la dynamine, les mécanismes impliqués restent encore peu clairs (Nassoy and Lamaze, 2012; Parton and del Pozo, 2013).

Dans les macrophages, il existe un mécanisme d'entrée des LDL indépendant des récepteurs : la macropinocytose. C'est un mécanisme d'endocytose de phase fluide formant de grosses vésicules de taille hétérogène (Benmerah and Lamaze, 2002). Ce mécanisme n'est pas spécifique des lipoprotéines, il permet également l'internalisation des bactéries et des complexes immuns par les cellules immunitaires.

La macropinocytose est la voie responsable de la formation des cellules spumeuses en présence de LDL natives (Kruth et al., 2005). Les LDL acétylées et oxydées sont aussi susceptibles d'être internalisées par cette voie comme l'ont montré *in vitro* N.L. Jones et M.C. Willingham (Jones and Willingham, 1999). Les LDL faiblement oxydées présentes dans l'espace sous-endothélial stimulent le récepteur TLR4 (Toll-like receptor 4) exprimé à la surface des macrophages. Cela active la macropinocytose et favorise la formation des cellules spumeuses (Miller et al., 2009). Après leur formation, les macropinosomes suivent des voies de transport proches de celles empruntées par les endosomes issus de l'endocytose clathrine-dépendante. Ainsi, dans les macrophages, les macropinosomes acquièrent des marqueurs du LE tel que Rab7 puis fusionnent avec les lysosomes (Kerr and Teasdale, 2009). Plusieurs acteurs de la macropinocytose ont été identifiés dont les Rho GTPases, l'actine et les microtubules.

II. 4. Le transport endosomal

Les vésicules formées lors de l'endocytose suivent la voie de transport intracellulaire formée par les différents compartiments endosomaux (Figure 10).

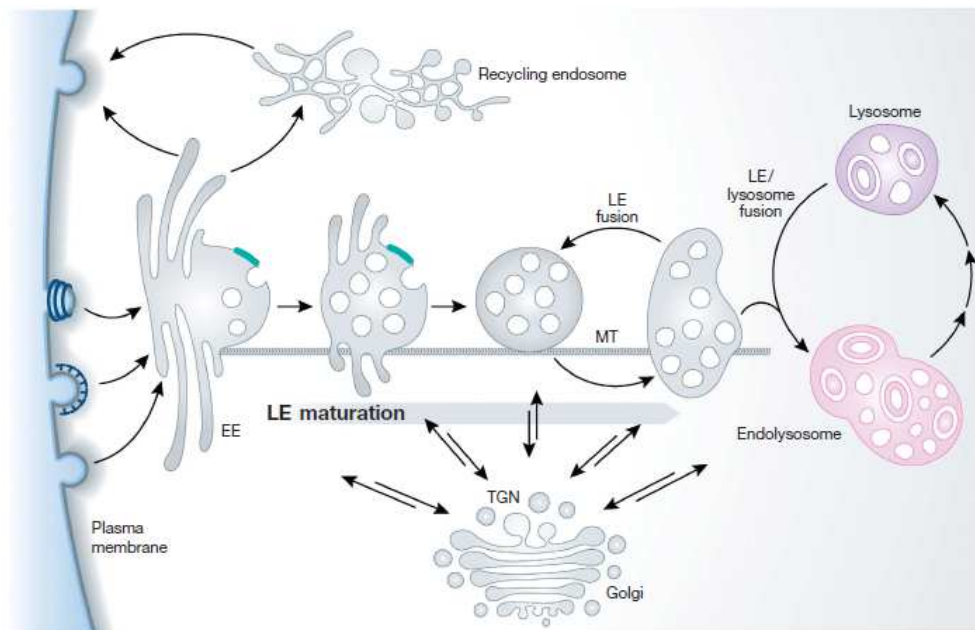


Figure 10 : Le système endosomal

Les vésicules d'endocytose fusionnent avec les endosomes précoces (EE) situés à la périphérie de la cellule. Depuis les endosomes précoces, certains cargos sont recyclés à la membrane plasmique directement ou après avoir transité dans le compartiment de recyclage. Après une quinzaine de minutes, les endosomes commencent leur maturation en endosomes tardifs (LE). Durant cette maturation, les endosomes forment de nombreuses vésicules intraluminales. Cette transformation s'effectue en parallèle d'un déplacement le long des microtubules (MT) vers la zone périnucléaire. Les endosomes tardifs fusionnent entre eux et avec les lysosomes pour la dégradation des cargos. TGN, *trans*-Golgi network. D'après (Seaman, 2004).

II. 4. a. Etapes précoces du transport intracellulaire : endosomes précoces et endosomes de recyclage

Les vésicules nouvellement formées par les différentes voies d'endocytose fusionnent entre elles et avec les EE. Les EE doivent leur nom au fait que les cargos y sont localisés à des temps précoces de l'endocytose (10 à 15 minutes). Autrefois, l'EE était considéré comme une simple étape dans le trafic mais aujourd'hui il est considéré comme ayant un rôle primordial dans le tri et l'adressage des cargos vers les différentes voies de transport intracellulaire (Seaman, 2004). Les EE sont de petits endosomes généralement proches de la membrane plasmique avec une partie tubulaire et une partie vacuolaire. La partie structurée en tubules permet la sortie des cargos vers le réseau *trans*-golgien (TGN, *trans*-Golgi network) ou l'ERC (Bonifacino and Rojas, 2006). Dans les cellules de mammifères, la majorité des cargos endocytés est rapidement recyclée.

Les cargos qui doivent être dégradés sont donc retenus spécifiquement dans les EE dans une zone particulière destinée à rejoindre la voie dégradative : la partie vacuolaire. A ce niveau, les protéines sont concentrées dans des zones de la membrane qui s'invaginent et forment des vésicules intra-luminales (ILVs, intraluminal vesicles). Cela permet que les récepteurs ne soient plus en contact avec le cytoplasme et stoppe l'activation des voies de signalisation intracellulaires (Seaman, 2004).

La formation des ILVs est contrôlée par un ensemble de protéines : les complexes ESCRT (0, I, II et III) (endosomal sorting complexes required for transport) et leurs protéines accessoires. Le signal de reconnaissance par les complexes ESCRT est la mono-ubiquitination des protéines (Raiborg and Stenmark, 2009). Chez la Levure la déplétion en composants de la machinerie ESCRT entraîne une diminution du nombre d'ILVs et le blocage des cargos dans des endosomes anormaux (Rieder et al., 1996).

Un bon exemple du tri accompli par l'EE est celui des LDL et des LDL-R. Le pH acide (pH 5,9-6,8) des EE permet la dissociation des LDL de leur récepteur. Les récepteurs retournent à la membrane plasmique par l'intermédiaire de l'ERC tandis que les LDL sont dirigées vers les LE puis les lysosomes (Mesmin and Maxfield, 2009).

Il est généralement considéré que les EC contenus dans les LDL sont hydrolysés dans les compartiments tardifs par des lipases acides lysosomales. Cependant, l'équipe de T.Y. Chang a montré la présence d'une lipase acide dans des compartiments précoces où du cholestérol libre pourrait être formé (Sugii et al., 2003).

II. 4. b. Conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs

Les cargos contenus dans les ILVs des EE sont destinés à être dégradés. Ils doivent pour cela atteindre les lysosomes où sont présentes les enzymes de dégradation. Les EE sont donc convertis en LE capables de fusionner avec les lysosomes. Les modifications qui interviennent pendant cette transition sont :

- la modification de la composition membranaire des endosomes,
- la concentration des endosomes dans la région périnucléaire,
- la modification des spécificités de fusion,
- l'augmentation du nombre d'ILVs accompagnée d'une acidification de leur lumière (Seaman, 2004).

- La modification la plus significative est le remplacement du marqueur précoce Rab5 caractéristique des EE par le marqueur du compartiment tardif Rab7 (Towbin et al., 1979).

Aux débuts de l'étude de la voie endocytaire, le passage des compartiments précoces aux compartiments tardifs a été considéré comme suivant le paradigme du transport vésiculaire. Actuellement, le mécanisme considéré comme régulant cette étape est la maturation progressive des EE en LE (Towbin et al., 1979). Le modèle de maturation est d'autant plus favorisé aujourd'hui puisque les mécanismes moléculaires qui régulent le « switch » Rab5/Rab7 ont été décrits (Poteryaev et al., 2010).

Il existe toutefois des données qui sont en faveur d'un transport de nature vésiculaire (Gruenberg and Stenmark, 2004). Il est donc possible que les deux mécanismes, transport vésiculaire et maturation endosomale, coexistent.

II. 4. c. Transport rétrograde directement vers l'appareil de Golgi

Il existe en parallèle de la voie de dégradation, une voie directe entre les endosomes et le TGN, la voie rétrograde (Figure 11). Cette voie a été mise en évidence grâce à l'étude du transport de la toxine de Shiga (Mallard et al., 1998; Sandvig et al., 1992). La voie rétrograde a ensuite été caractérisée chez la Levure *Saccharomyces cerevisiae* comme la voie de recyclage des récepteurs des hydrolases vers le TGN (Seaman et al., 1998).

Le rôle principal de la voie rétrograde est de renvoyer les composants ayant permis l'acheminement de cargos depuis le TGN vers la membrane ou l'endosome jusqu'à leur compartiment d'origine. Elle permet aussi de compenser le flux antérograde généré par la voie de biosynthèse/sécrétion, assurant ainsi l'homéostasie des organelles. Le récepteur le plus abondant et le mieux caractérisé empruntant cette voie est le récepteur au mannose-6-phosphate (MPR, mannose-6-phosphate receptor). Sa fonction est d'adresser les hydrolases nouvellement synthétisées dans le Golgi aux endosomes (Sandvig et al., 1992). Une fois le récepteur arrivé au niveau de l'endosome, il se détache de l'enzyme qui suit la voie dégradative pour atteindre le lysosome. Pour être recyclé, le MPR est concentré au niveau de zones de la membrane des endosomes, qui forment des tubules, puis des vésicules qui fusionnent avec le TGN (Arighi et al., 2004). Le transport rétrograde peut avoir lieu depuis les EE mais aussi les LE (Bonifacino and Rojas, 2006).

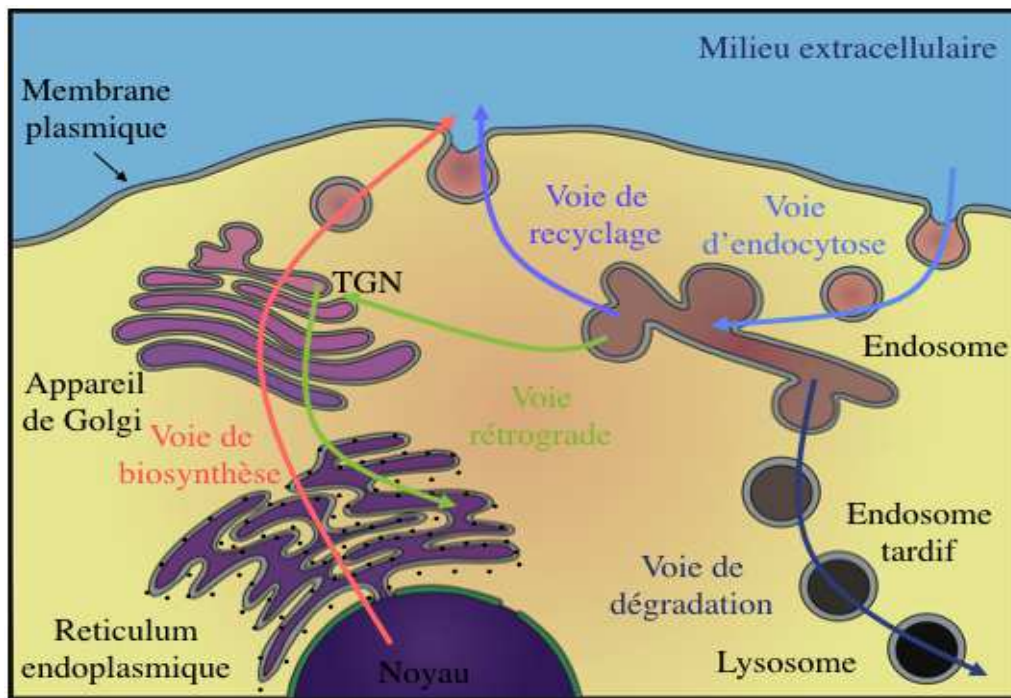


Figure 11 : La voie du transport rétrograde

La voie du transport rétrograde correspond aux passages de molécules depuis la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique *via* les endosomes et l'appareil de Golgi. D'après (Popoff, 2008).

La voie rétrograde a été décrite récemment et la liste des protéines qui l'empruntent augmente rapidement : SNAREs, transporteur du glucose (GLUT4) et enzymes (Furin et MMP). Certaines protéines exogènes, notamment de bactéries et de virus, utilisent cette voie pour échapper à la voie dégradative. La toxine de Shiga (*Shigella dysenteriae*), la toxine cholérique, la ricine, par exemple, suivent cette voie de transport intracellulaire (Johannes and Popoff, 2008).

Concernant les lipides, il n'est pas encore clair s'ils empruntent cette voie de façon spécifique. Ce qui est sûr, c'est que le Gb3, un lipide minoritaire de la membrane plasmique et récepteur cellulaire de la toxine de Shiga, reste lié à celle-ci tout le long du transport rétrograde jusqu'au Golgi (Popoff, 2008).

C'est un complexe multi-protéique, le complexe rétromère, qui régule le transport rétrograde. Il sélectionne les cargos et promeut la formation de structures tubulaires servant d'intermédiaire de transport entre l'endosome et le TGN.

Deux sous-unités fonctionnelles interviennent. D'abord, un dimère composé de deux sorting nexin (Snx) (Snx1 ou Snx2 d'une part, et, Snx5 ou Snx6, d'autre part) permettant la

formation des tubules. Puis, un second complexe formé de Vps26 (vacuolar protein sorting 26), Vps29 et Vps35 qui permet de sélectionner le cargo au niveau de la membrane donneuse (Bonifacino and Hurley, 2008). D'autres régulateurs interviennent dans cette voie comme le montre le fait que leur inhibition par ARN interférence empêche le transport des cargos modèles jusqu'au TGN : clathrine, Vti1a (Saint-Pol et al., 2004), STX16 (Leventhal et al., 2004) et STX10 (Ganley et al., 2008).

Des recherches génétiques ont relié des déficits en transport rétrograde avec des pathologies du système nerveux telle que la maladie d'Alzheimer (Burd, 2011).

II. 4. d. Endosomes tardifs et lysosomes

Les LE ont une forme ronde caractéristique. Ils ont une localisation périnucléaire, peuvent fusionner entre eux et avec les lysosomes (Luzio et al., 2007). Les LE sont aussi appelés MVB (multivesicular bodies) parce qu'ils contiennent de nombreuses ILVs observables par microscopie électronique. Ces vésicules peuvent varier en taille et en composition mais contiennent les cargos à dégrader (Seaman, 2004).

Les membranes de ces ILVs sont riches en cholestérol et en LBPA/BMP (lysobisphosphatidic acid/bismonoacylglycerophosphate), phospholipide négatif qui permet de recruter les hydrolases acides. Ce phospholipide joue un rôle structural important en permettant la forte courbure nécessaire pour former les ILVs. Il assure aussi un rôle régulateur dans la mobilisation du cholestérol depuis ces ILVs (Kobayashi et al., 1999). Dans le syndrome des anticorps anti-phospholipides, des auto-anticorps dirigés contre le LBPA/BMP sont produits qui provoquent une altération de la sortie des cargos des MVB (Kobayashi et al., 1998).

Les lysosomes contiennent de nombreuses hydrolases (plus d'une cinquantaine) qui permettent la dégradation des macromolécules en molécules plus petites. Ces hydrolases ont une activité optimale à pH acide (environ pH 5), c'est pourquoi les lysosomes possèdent à leur surface des pompes à protons ATP dépendantes qui permettent de maintenir un pH bas (Mellman et al., 1986). La fusion des LE et des lysosomes aboutit à la formation d'organelles hybrides où a lieu la dégradation des macromolécules. Il est difficile d'identifier clairement les LE, les hybrides et les lysosomes sachant qu'ils partagent un grand nombre de caractéristiques communes. Les hybrides constituent le compartiment endolysosomal. La principale fonction des endolysosomes est d'alimenter le métabolisme cellulaire mais ils peuvent aussi avoir un rôle dans l'immunité en dégradant les bactéries (phagocytose) et

dans la survie cellulaire en dégradant les organelles âgées (auto-phagocytose) (Luzio et al., 2007).

C'est dans le compartiment endolysosomal, que les EC contenus dans les LDL sont hydrolysés par la lipase acide lysosomale (LAL, lysosomal acid lipase) ou l'hydrolase acide des EC (aCEH, acid cholesterol ester hydrolase) pour libérer du cholestérol et des acides gras. La membrane des endolysosomes étant pauvre en cholestérol, ceci suggère que la majorité du cholestérol nouvellement libéré quitte rapidement ce compartiment (Soccio and Breslow, 2004).

II. 5. La sortie du compartiment endosomal

Le compartiment endolysosomal joue un rôle central dans la régulation de la distribution intracellulaire du cholestérol. En effet, après la dégradation des LDL, le cholestérol libéré doit atteindre différents compartiments pour permettre le maintien des fonctions cellulaires et l'homéostasie intracellulaire du cholestérol.

Les mécanismes mis en jeu pour la sortie du cholestérol du compartiment endolysosomal ont un rôle critique dans le trafic et l'homéostasie cellulaire du cholestérol comme le montrent les perturbations observées dans la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC) (Vanier and Millat, 2003). Cette maladie, à transmission autosomique récessive, causée par la mutation des protéines NPC-1 ou NPC-2, présente un phénotype d'accumulation du cholestérol libre dans les LE. Cela suggère que NPC-1 et NPC-2 jouent un rôle crucial dans la sortie du cholestérol du compartiment endolysosomal.

Sur le plan clinique, la maladie est caractérisée par l'apparition plus ou moins précoce d'une atteinte neurologique progressive et/ou d'une hépatomégalie. Dans la forme la plus répandue de la maladie, dès l'enfance, des troubles neurologiques (ataxie, épilepsie, troubles de l'élocution et de la déglutition) apparaissent, pouvant être accompagnés de troubles psychiatriques (Vanier and Millat, 2003). Au niveau cellulaire, les cellules NPC présentent, outre une accumulation endolysosomale du cholestérol, un retard de l'inhibition de la capture des LDL et de la synthèse endogène du cholestérol ainsi qu'une diminution de l'estérification du cholestérol témoignant de la diminution de l'arrivée du cholestérol au RE (Carstea et al., 1997).

Le phénotype NPC peut être mimé dans les cellules par l'utilisation d'une amine cationique amphiphile, l'U18666A, qui bloque la sortie du cholestérol libre du compartiment

endolysosomal (Liscum and Faust, 1989). Cette amine agit en se liant au LBPA/BMP présent dans les membranes des ILVs et empêche la mobilisation du cholestérol par les protéines NPC (Cenedella, 2009).

NPC-1 est une protéine exprimée spécifiquement à la membrane des Les. Elle possède un domaine SSD identique à celui retrouvé chez l'HMGCoAR (Carstea et al., 1997) (Figure 12). Le cholestérol et les oxystérols peuvent s'y lier mais l'implication de cette interaction reste à définir. L'expression de NPC-1 est régulée par les concentrations intracellulaires en cholestérol (Garver et al., 2008).

NPC-2 est une protéine liant le cholestérol, présente dans les LE et des lysosomes (Figure 12). Elle pourrait transférer le cholestérol au niveau de domaines ou à des protéines spécifiques des membranes externes du compartiment endolysosomal (Storch and Xu, 2009).

Ces protéines différentes sur le plan fonctionnel et structural semblent agir de façon séquentielle dans une voie commune de transport du cholestérol, comme le suggère le fait qu'une mutation de l'une ou l'autre des protéines entraîne le même phénotype (Carstea et al., 1997). Cette hypothèse a été confirmée par l'étude structurale de NPC-1 et NPC-2 ainsi que de leurs interactions. Le cholestérol libéré dans les ILVs est pris en charge par NPC-2 (Figure 12). Il est ensuite transféré directement à la partie N-terminale de NPC-1 sans passer dans le milieu aqueux. NPC-1 permet de mettre le cholestérol libre à disposition au niveau de la membrane externe des endolysosomes (Kwon et al., 2009).

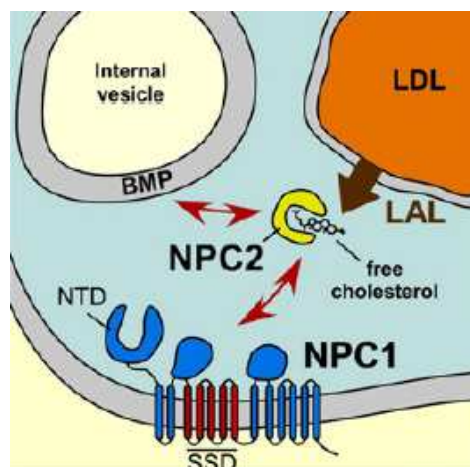


Figure 12 : Rôle de NPC-1 et NPC-2 dans la sortie du cholestérol des MVB

Le cholestérol libéré par hydrolyse des LDL (low density lipoprotein) dans les ILVs (intraluminal vesicles) par la LAL (lysosomal acid lipase) est pris en charge par NPC-2 qui le transfère ensuite à NPC-1 localisé à la membrane externe des MVB. BMP,

bismonoacylglycerophosphate; NPC, Niemann-Pick type C; NTD, N-terminal domain; SSD, sterol sensing domain. D'après (Mesmin and Maxfield, 2009).

Deux autres protéines principales sont impliquées dans la sortie du cholestérol du compartiment endolysosomal : MLN64 (metastatic lymph node 64) et ORP1L (oxysterol related protein 1 L) (Figure 13).

MLN64 est une protéine de la famille START. Elle se lie au cholestérol et facilite sa sortie des LE vers des accepteurs cytoplasmiques ou des membranes acceptrices (Alpy and Tomasetto, 2005). MLN64 jouerait sur les phénomènes d'interaction avec le cytosquelette pour favoriser la fusion des endosomes avec les lysosomes (Holtta-Vuori et al., 2005). Il a aussi été montré que MLN64 peut, indépendamment de NPC-1, transférer le cholestérol vers la mitochondrie (Charman et al., 2010).

ORP1L appartient, quant à lui, à la famille des ORP. Il est localisé à la surface externe des LE et il est l'accepteur final des stérols amenés à la membrane par les actions successives de NPC-2 puis NPC-1. Son rôle est de réguler l'interaction entre le complexe Rab7/RILP (Rab interacting lysosomal protein) et les moteurs moléculaires (Johansson et al., 2007). Le fonctionnement du complexe Rab7/ORP1L/RILP sera plus amplement décrit dans le chapitre III. 2. b.. ORP1L est capable de lier un grand nombre d'oxystérols et notamment le 7-kétocholestérol qui est abondamment retrouvé dans les lésions athéroscléreuses, mais aussi le cholestérol. En raison de l'abondance de ce dernier par rapport aux oxystérols, il est vraisemblable que le cholestérol soit le véritable ligand d'ORP1L. Des actions potentiellement différentes entre la liaison du cholestérol et des oxystérols à ORP1L restent à étudier (Vihervaara et al., 2011).

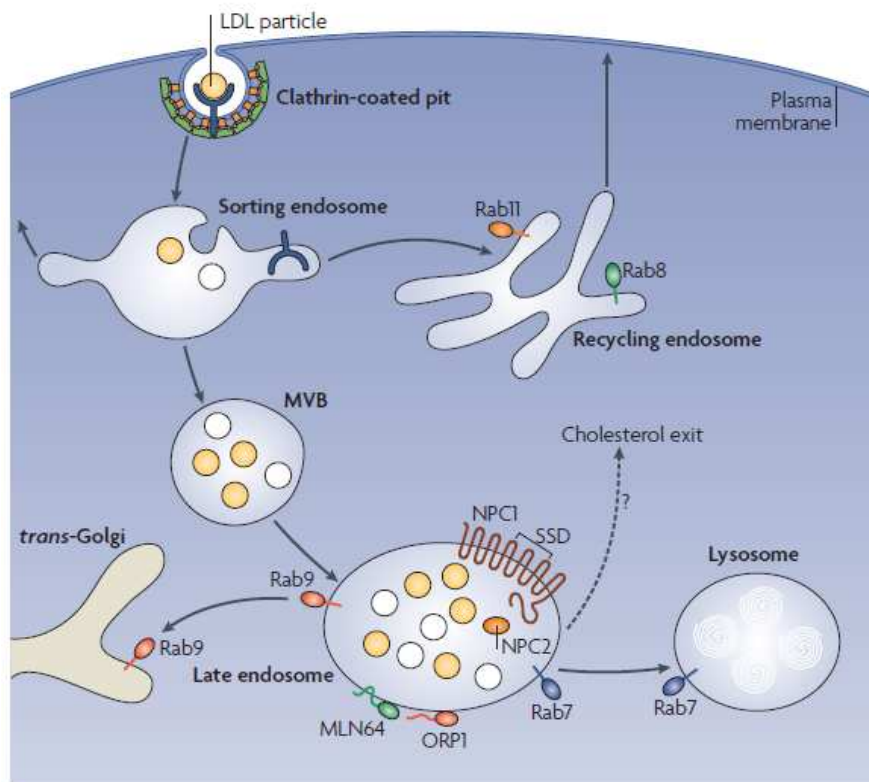


Figure 13 : Les acteurs du trafic endolysosomal du cholestérol

Le processus de sortie du cholestérol de l'endosome tardif n'est pas encore bien caractérisé. Cependant, certains acteurs sont identifiés : NPC-1 et NPC-2 dont l'inhibition bloque l'efflux du cholestérol de l'endosome tardif, MLN64 et ORP1L qui ont la capacité de se lier aux stérols ainsi que Rab7 et Rab9 qui sont impliquées dans l'interface endosome tardif/lysosome/Golgi. LDL, low density lipoprotein; MNL64, metastatic lymph node 64; MVB, multivesicular body; NPC, Niemann-Pick type C; ORP1, oxysterol-related protein 1; SSD, sterol-sensing domain. D'après (Ikonen, 2008).

II. 6. Le devenir du cholestérol après la sortie du compartiment endosomal

Une fois le cholestérol libéré des endolysosomes, différents pools vont se dessiner : un pool va permettre la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau du RE et un autre pool va être utilisé pour fournir le cholestérol au niveau de la membrane plasmique (Ikonen, 2008). Une autre partie du cholestérol est adressée aux mitochondries. Le cholestérol libre supplémentaire est toxique. Il sera soit stocké au niveau de gouttelettes lipidiques, soit transporté hors de la cellule.

Le cholestérol adressé au RE peut emprunter deux voies. La majorité du cholestérol transporté vers le RE (70%) emprunte une voie vésiculaire passant par le Golgi, puis la membrane plasmique (Neufeld et al., 1996) (Figure 6). Urano et coll. ont montré par ARN interférence que cette voie est dépendante de plusieurs protéines: VAMP4 (vesicle-associated membrane protein 4), STX6 et STX16 mais aussi NPC-1 (Urano et al., 2008). Il existe également une voie directe, minoritaire, du compartiment endolysosomal vers le RE. Elle peut impliquer un transport de type vésiculaire ou non vésiculaire (Soccio and Breslow, 2004).

Il y a peu de données sur la voie de transport du cholestérol jusqu'à la membrane plasmique. On peut supposer que le cholestérol emprunte la même voie que le cholestérol destiné à atteindre le RE. Il passe par le Golgi puis suit la voie de sécrétion jusqu'à la membrane plasmique.

Le transport du cholestérol vers les mitochondries est assuré par des protéines de la famille START dont MLN64 et STARD4 (Mesmin and Maxfield, 2009). Au niveau de la mitochondrie intervient la protéine StAR qui transfère le cholestérol des membranes externes aux membranes internes (Miller, 2007). Dans les gonades, les glandes surrénales et le cerveau, le cholestérol est utilisé pour la synthèse *de-novo* des hormones stéroïdes. Dans les autres types cellulaires, la 27-hydroxylase, située au niveau de la membrane interne des mitochondries forme des oxystérols. Cette enzyme est retrouvée dans la plupart des tissus mais c'est dans les macrophages qu'elle est le plus exprimée (Souidi et al., 2004). Les oxystérols sont des seconds messagers lipidiques qui participent à la régulation du métabolisme des lipides *via* des facteurs de transcription.

III. Les Rab GTPases, des acteurs privilégiés du transport vésiculaire

III. 1. Généralités

Les cellules eucaryotes sont composées d'un ensemble complexe de compartiments subcellulaires. Pour assurer la communication entre ces différents compartiments, il existe un système de transport contrôlé entre les membranes des organelles. Les protéines Rab (Ras-related proteins in brain) sont responsables du contrôle spatio-temporel de ce transport. Elles régulent toutes les étapes du transport vésiculaire : la sélection du cargo, la formation des vésicules de transport au niveau du compartiment donneur, leur mobilité, ainsi que leur adressage et leur fusion avec le compartiment accepteur (Stenmark, 2009).

Les protéines Rab sont des petites GTPases qui appartiennent à la superfamille des protéines p21 Ras. Plus de 60 Rab ont été identifiées chez l'Homme mais seulement la moitié d'entre-elles a été caractérisée sur le plan fonctionnel. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire mais les niveaux individuels d'expression peuvent être très variables selon les types cellulaires. De plus, en fonction des besoins cellulaires, le niveau d'expression des Rab peut être régulé (Stein et al., 2003). L'importance fonctionnelle des Rab est soulignée par l'existence de nombreuses maladies (immunodéficiences, cancer et maladies neurologiques) lorsqu'elles sont mutées (Mitra et al., 2011).

Les Rab GTPases sont de plus en plus étudiées et de mieux en mieux décrites mais les mécanismes d'action de certaines restent encore mal définis.

III. 1. a. Le cycle des Rab GTPases

Les Rab sont localisées, sous leur forme active, à la surface cytosolique des vésicules impliquées dans les voies de biosynthèse, de sécrétion et d'endocytose.

Les Rab sont synthétisées sous la forme de protéines solubles dans le cytosol. Elles sont prises en charge par une protéine chaperone REP (Rab escort protein). Cette protéine les met en contact avec la RabGGT ou Rab géranylgéranyl transférase qui leur transfère des composés géranylgéranyl au niveau de l'extrémité C-terminale (Figure 14). Cette modification post-traductionnelle est nécessaire pour permettre l'insertion des Rab dans les membranes cellulaires et assurer leur activité biologique (Corbeel and Freson, 2008). REP

permet aussi de limiter l'activation des Rab avant leur adressage à la membrane appropriée (Kielar et al., 2001).

Une protéine Rab agit comme un interrupteur moléculaire. En effet, elle alterne entre deux états : un état actif lié au GTP (guanine triphosphate) et un état inactif lié au GDP (guanine diphosphate) (Figure 14).

A l'état initial, un facteur inhibiteur de la dissociation du GDP, GDI (GDP dissociation inhibitor), maintient la Rab à l'état inactivé dans le cytosol. Au niveau de la membrane, GDF (GDI displacement factor) déplace GDI ce qui permet au facteur d'échange GEF (guanine nucleotide exchange factor) d'activer la Rab en catalysant l'échange du GDP en GTP. La forte concentration cytosolique de GTP permet la fixation de celui-ci, aussitôt le GDP relâché. La forme GTP de la Rab s'insère dans la membrane où elle est capable de recruter de nombreux types d'effecteurs. L'inactivation de la Rab, qui correspond à la conversion du GTP en GDP, est assurée par l'activité GTPasique de la protéine Rab mais est aussi catalysée par une GAP (GTPase activating protein) (Stenmark, 2009). A la fin du cycle, GDI détache la Rab de la membrane et la séquestre sous forme inactive jusqu'au prochain cycle.

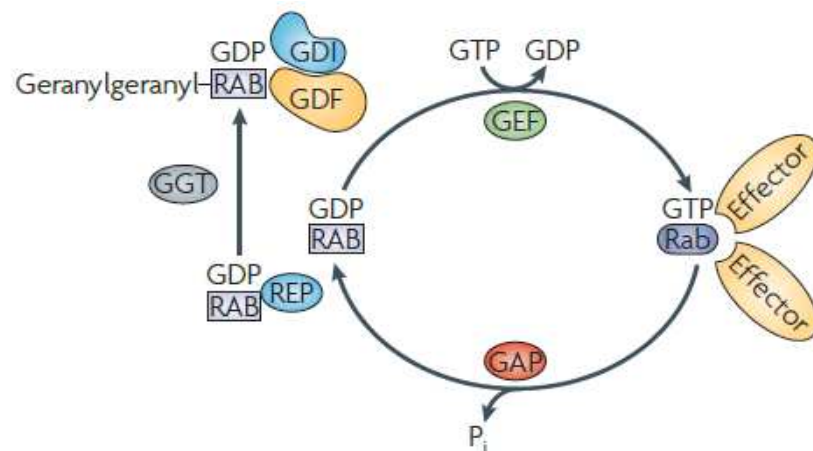


Figure 14 : Le cycle d'activation des Rab GTPases

Au début du cycle, la Rab est inactive sous forme GDP. Le GDI (GDP dissociation inhibitor) maintient la Rab à l'état inactivé dans le cytosol. Au niveau de la membrane donneuse, le GDF (GDI displacement factor) déplace le GDI ce qui permet au GEF (guanine nucleotide exchange factor) d'activer la Rab sous forme GTP. Une vésicule est formée et se détache. La Rab recrute des molécules effectrices pour la migration, l'attachement et la fusion des vésicules à la membrane acceptrice. La GAP (GTPase activating protein) catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP par la Rab. Le GDI est recruté et détache la Rab de la membrane. La Rab retourne à l'état initial pour débuter un nouveau cycle. GDP, guanine diphosphate; GGT, geranylgeranyl transferase; GTP, guanine triphosphate; REP, Rab escort protein. D'après (Stenmark, 2009).

Il existe des mutants dominants actifs ou inactifs des Rab. Les mutants inactifs possèdent une mutation qui provoque le blocage de la protéine à l'état GDP inactif. Il s'agit généralement d'une mutation d'une thréonine vers la position 20 par une asparagine. Pour les mutants actifs, le remplacement d'une glutamine autour de la position 70 en leucine résulte en une activation constitutive de la Rab sous la forme liée au GTP. L'utilisation de ces mutants a permis d'identifier les étapes du transport contrôlées par les différentes Rab.

III. 1. b. Localisation des Rab GTPases

Chaque Rab a une localisation préférentielle (Figure 15). A titre d'exemple, Rab5 est localisée au niveau de la membrane des EE, Rab11 se situe au niveau de l'ERC tandis que, Rab7 et Rab9 agissent au niveau des LE. Rab6, quant à elle se localise au niveau de l'appareil de Golgi et du TGN (Darchen and Goud, 2000). Cette spécificité de localisation n'est pas encore bien expliquée. Cependant, elle pourrait être liée à la localisation des GDF et des GEF qui participent à l'activation des Rab au niveau de la membrane (Chen et al., 2005; Sivars et al., 2003).

Cependant, plusieurs Rab peuvent être localisées au niveau d'une même membrane. Dans ce cas, elles ne se mélangent pas pour autant et elles restent groupées au sein de micro-domaines membranaires appelés « Rab domains» (Yokoyama, 2006). Rab4 et Rab5 sont localisées au niveau de l'EE dans des sous-domaines distincts (Sonnichsen et al., 2000). De la même manière, Rab4 et Rab11 sont toutes les deux retrouvées au niveau des ERC l'une permettant d'y arriver, l'autre d'en sortir (Zerial and McBride, 2001). Le LE possède au niveau de sa membrane des zones enrichies en Rab7 et d'autres en Rab9 (Barbero et al., 2002), ces Rab permettant respectivement le transport vers le lysosome ou le Golgi.

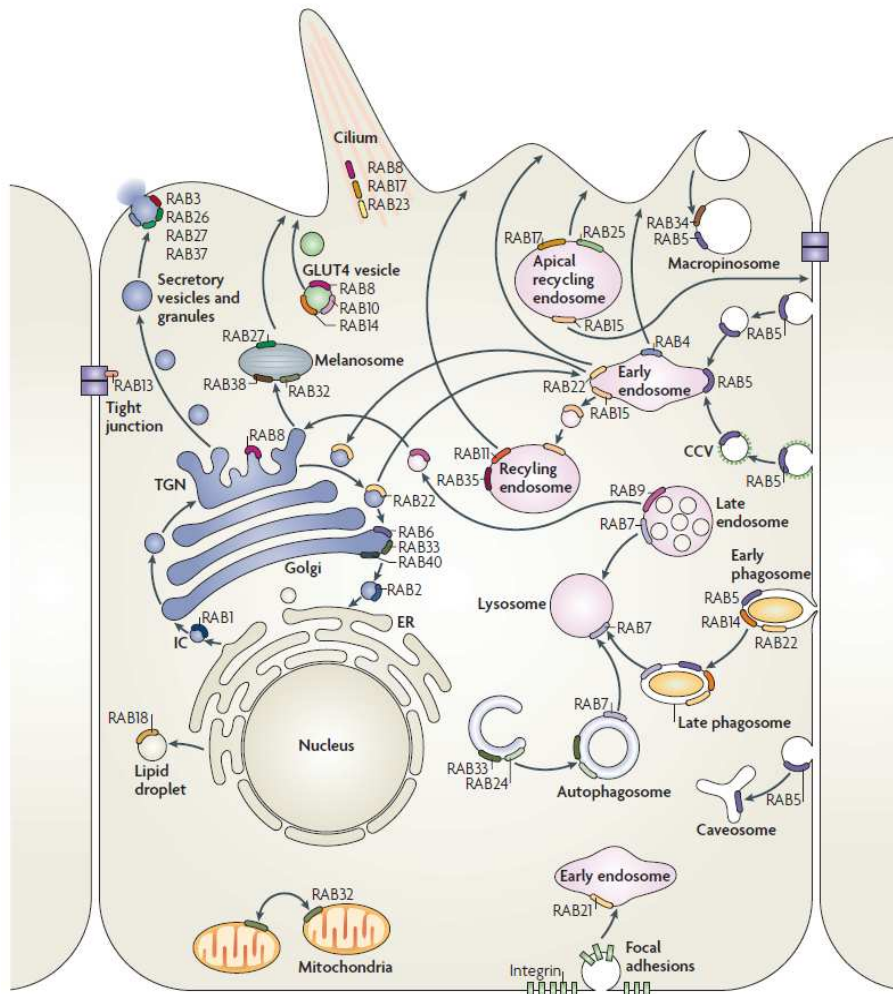


Figure 15 : Localisation des Rab

CCV, clathrin-coated vesicle; ER, endoplasmic reticulum; IC, pre-Golgi intermediate compartment; TGN, *trans*-Golgi network. D'après (Stenmark, 2009).

III. 1. c. Protéines effectrices des Rab GTPases

Les protéines Rab activées interagissent avec un répertoire spécifique de molécules effectrices notamment pour assurer la mobilité et le ciblage des vésicules auxquelles elles sont liées (Figure 16) (Grosshans et al., 2006). Les différents types d'acteurs sont :

- les molécules qui permettent la sélection des cargos et le bourgeonnement des vésicules,
- les PI (phosphate inositol) kinases et les PI phosphatases qui permettent de modifier la composition de la membrane des vésicules,
- les moteurs moléculaires qui permettent la mobilité des vésicules le long des filaments d'actine ou des microtubules,

- les facteurs d'arrimage qui permettent la spécificité d'adressage des vésicules,
- ainsi que les protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors) qui contrôlent le ciblage et la fusion des vésicules avec la membrane acceptrice.

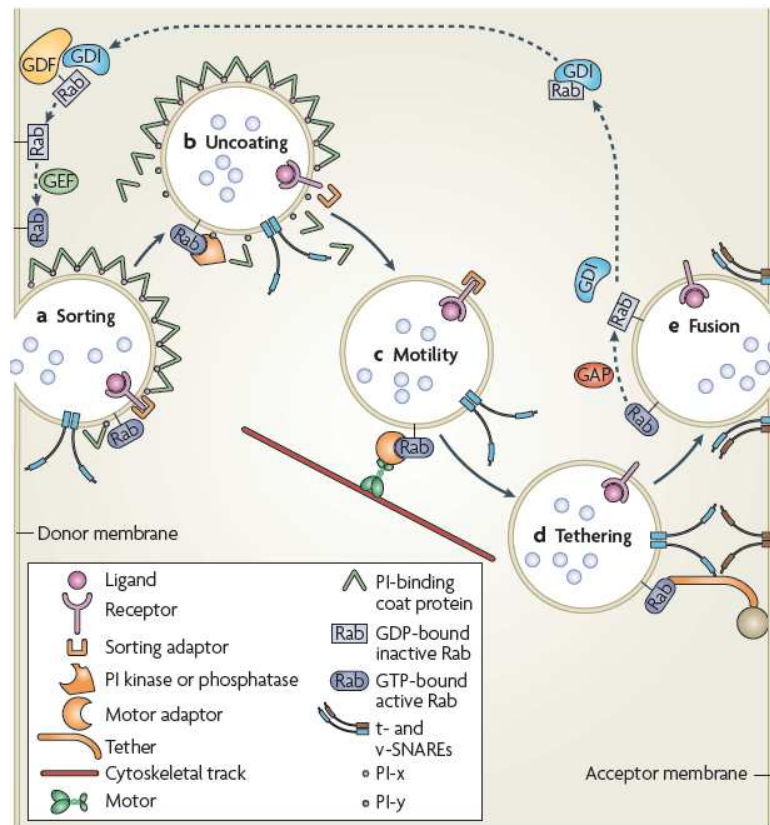


Figure 16 : Les différentes fonctions des Rab GTPases

a. la sélection des cargos b. la perte du manteau de la vésicule c. la mobilité le long du cytosquelette d. l'arrimage de la vésicule e. la fusion avec le compartiment accepteur. GAP, GTPase activating protein; GDF, GDI displacement factor; GDI, GDP dissociation inhibitor; GEF, guanine nucleotide exchange factor. D'après (Stenmark, 2009).

III. 1. d. Rab GTPases et cholestérol

Les fonctions de ces protéines Rab sont être influencées par la teneur en cholestérol des membranes (Choudhury et al., 2004). En effet, l'enrichissement des membranes en cholestérol stabilise la liaison des Rab-GTP aux membranes par un mécanisme encore mal compris. Il a été proposé que le changement de la fluidité de la bicouche lipidique puisse rendre moins accessible l'ancre prénylée des Rab pour le GDI (Ganley and Pfeffer, 2006;

Lebrand et al., 2002). Ainsi, le fait de charger les cellules avec du cholestérol empêche l'extractibilité de plusieurs Rab dont notamment Rab4, Rab5, Rab7 et Rab9 (Schmitz and Grandl, 2009).

Concernant le transport intracellulaire du cholestérol, plusieurs Rab ont été décrites comme régulant les différentes étapes de ce transport (Ikonen, 2008). Rab4 et Rab5 participent aux étapes précoces de l'endocytose des LDL, alors que Rab7 et Rab9 sont impliquées dans les étapes plus tardives (voir les chapitres III.2. et III.3.). D'autres Rab participent au trafic du cholestérol au niveau du compartiment de recyclage telles Rab4, Rab8 et Rab11. Enfin Rab18 pourrait réguler la formation des gouttelettes lipidiques et la mobilisation du cholestérol à partir de celles-ci (cette partie sera développée dans le chapitre V.I.).

Rab4 est préférentiellement localisée au niveau de la membrane des endosomes de recyclage et des EE. Elle participe au recyclage rapide depuis les EE (Mohrmann and van der Sluijs, 1999).

Rab5 est spécifiquement exprimée à la membrane des EE et contrôle de nombreuses fonctions. Il a été montré *in vitro* que Rab5 régule la fusion entre les vésicules d'endocytose et les EE, mais aussi la fusion homotypique des EE (Gorvel et al., 1991). Rab5 est également nécessaire pour déclencher le processus de maturation des EE en LE (Towbin et al., 1979). Enfin, Rab5 est aussi retrouvée au niveau des CCP. A ce niveau, son rôle est de permettre la perte du manteau de clathrine une fois la vésicule d'endocytose formée (Kornfeld, 1992).

Rab8 est localisée au niveau du TGN, des structures vésiculaires et des bourgeonnements membranaires. Elle participe au trafic polarisé vers la membrane plasmique en utilisant les compartiments de recyclage (Linder et al., 2007).

Rab 11 est exprimée à la surface des endosomes de recyclage et au niveau du Golgi. Son rôle est encore assez méconnu mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans le recyclage du cholestérol des compartiments de recyclage vers la membrane plasmique (Holtta-Vuori et al., 2002).

Rab7 et Rab9 sont impliquées dans le trafic vésiculaire au niveau du compartiment endolysosomal (Figure 13). Nous nous sommes particulièrement intéressés à ces Rab car leur surexpression dans les cellules NPC permet de rétablir le transport du cholestérol (Choudhury et al., 2002).

III. 2. Rab7

Au moment de sa découverte, Rab7 a été décrite comme associée au LE et aux lysosomes (Chavrier et al., 1990; Meresse et al., 1995). La première description de son rôle a été faite chez la Levure et a montré que Rab7 régule la fusion entre les LE et les lysosomes (Haas et al., 1995). Les premières études se sont donc concentrées sur le rôle de Rab7 dans la voie dégradative. L'équipe de C. Bucci a étudié l'effet de mutants dominants négatifs de Rab7 sur la dégradation des LDL et a montré que celle-ci était réduite (Vitelli et al., 1997). Vanlandingham et coll. ont analysé le transport de l'EGF (epidermal growth factor) et de son récepteur (EGF-R). Ce complexe est un bon modèle d'étude de la voie de dégradation car la quasi-totalité du récepteur est dégradée dans les lysosomes. En inhibant Rab7 par ARN interférence, ils provoquent l'accumulation de l'EGF dans des LE élargis et réduisent sa dégradation (Vanlandingham and Ceresa, 2009). Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude où Rab7 était inhibée par la surexpression d'un mutant dominant négatif (Ceresa, 2006). Ces études ont montré que Rab7 est nécessaire pour la dégradation des cargos dans les lysosomes. En outre, lorsque qu'une forme inactive de Rab7 est exprimée dans les cellules, les lysosomes ne sont plus acidifiés et ne sont plus fonctionnels (Bucci et al., 2000). En revanche, l'activité de Rab7 ne semble pas requise pour la formation des ILVs puisque les cellules n'exprimant pas Rab7 contiennent des LE avec de nombreuses ILVs (Vanlandingham and Ceresa, 2009).

Rab7 influence la localisation des endosomes comme le prouve plusieurs publications dans lesquelles lorsque Rab7 n'est pas fonctionnelle, les endosomes sont plus dispersés (Rojas et al., 2008; Vanlandingham and Ceresa, 2009).

Aujourd'hui Rab7 est considérée comme un régulateur central du transport endolysosomal : cette Rab contrôle le transport entre les LE et les lysosomes, la fusion des LE entre eux et avec les lysosomes, la formation et le maintien des lysosomes, la mobilité des LE et la maturation des phagosomes en autophagosomes (Jager et al., 2004).

Plus récemment, un rôle émergent de Rab7 dès l'EE a été mis en évidence notamment pour la maturation des EE en LE (Poteryaev et al., 2010) et le recrutement du complexe rétromère (Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009). Dès 1995, Feng et coll. ont montré que Rab7 joue un rôle dans le transport précoce de certaines protéines virales (Gurkan et al., 2005).

III. 2. a. Fusion endosomale

Les LE ne peuvent fusionner qu'avec d'autres LE, des lysosomes ou des autophagosomes. Lors de la maturation des EE en LE, la machinerie de fusion est modifiée. Au niveau des EE, la spécificité de fusion est contrôlée par le complexe d'arrimage CORVET (class C core vacuole-endosome transport). Pour les LE, le contrôle des étapes de fusion est réalisé par le complexe HOPS (homotypic fusion and protein sorting complex), recruté par Rab7 (Nickerson et al., 2009). Les deux complexes sont formés d'un noyau commun appelé core (Vps11, Vps16, Vps18 et Vps33) mais recrutent des protéines accessoires différentes : Vps3/Vps8 et Vps39/Vps41 respectivement. Ces deux complexes sont des effecteurs des Rab et se fixent à leur forme active Rab-GTP. Le complexe CORVET interagit *via* Vps8 avec Rab5 pour réguler la biogénèse des EE alors que HOPS interagit avec Rab7 *via* Vps39 pour réguler les étapes de fusion des LE. La modification de la machinerie de fusion a lieu simultanément à la conversion Rab5/Rab7. La coordination entre les deux événements est possible grâce à la liaison de Vps39 à Rab7 qui favorise la maturation endosomale.

III. 2. b. Mobilité des endosomes tardifs

Les endosomes suivent des mouvements oscillatoires qui sont nécessaires pour les phénomènes de fission et de fusion. Ces mouvements sont dépendants de l'intégrité des microtubules comme le montre la dispersion des LE et lysosomes dans le cytoplasme causée par le nocodazole, agent dépolymérisant des microtubules (Bayer et al., 1998).

Les endosomes sont transportés vers l'extrémité positive ou négative des microtubules selon le type de moteurs moléculaires (kinésine ou dynéine) auxquels ils se lient (Figure 17 A). Le mouvement des LE et des lysosomes est régulé par l'interaction de Rab7 avec deux de ses effecteurs : ORP1L et RILP (Jordens et al., 2001).

RILP est une protéine cytosolique qui peut être recrutée par Rab7 à la membrane des LE. RILP est actif sous forme de dimère. Il interagit alors, d'une part, avec Rab7 et, d'autre part, avec la sous-unité p150(glued) de la dynactine. La surexpression de RILP induit un élargissement des endosomes et des lysosomes ainsi que leur regroupement dans la région périnucléaire. Cela suggère que RILP facilite la fusion entre les endosomes et participe aux mouvements des vésicules vers l'extrémité négative des microtubules (Cantalupo et al., 2001).

La séquence des événements qui permet le déplacement des vésicules Rab7 positives est la suivante : la forme active de Rab7 lie RILP et ORP1L qui à leur tour recrutent le récepteur β III spectrin et la sous-unité p150(glued) de la dynactine (Johansson et al., 2007). Le complexe étant relié à la dynéine, cela permet le transport de la vésicule vers l'extrémité négative des microtubules (Figure 17 B).

La présence d'ORP1L dans le complexe permet de réguler la mobilité des endosomes en fonction des concentrations de cholestérol. Lorsqu'il y a du cholestérol, ORP1L stabilise le complexe Rab7/RILP, favorise le recrutement de la dynactine et donc le mouvement des vésicules vers la région périnucléaire. L'accumulation de cholestérol dans les endosomes comme observée dans la maladie de NPC ou d'autres maladies provoque l'inhibition du transport bidirectionnel des endosomes et leur concentration dans la zone périnucléaire (Neufeld et al., 2004).

Lorsqu'il n'y a pas de cholestérol, ORP1L est dans une conformation différente et entraîne la dissociation du complexe Rab7/RILP. Les vésicules ne peuvent pas se lier à la dynéine. Dans ce cas, Rab7 pourrait recruter un autre effecteur, FYCO1, qui permet le transport vers l'extrémité positive des microtubules (Pankiv et al., 2010).

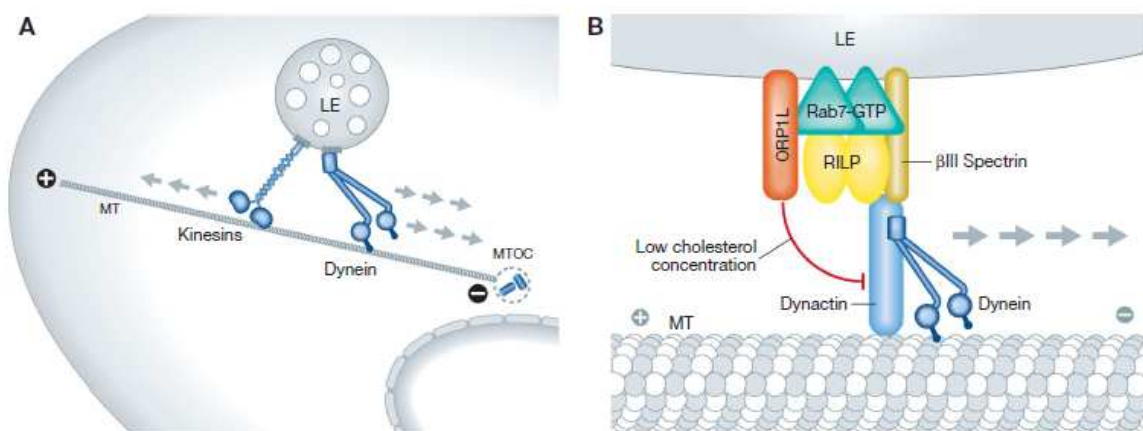


Figure 17 : Le contrôle de la mobilité des endosomes tardifs

A. Les endosomes tardifs (LE) peuvent se déplacer le long des microtubules grâce aux moteurs moléculaires kinésine et dynéine. B. la forme activée de Rab7 se lie avec RILP et ORP1L. RILP sous forme d'homodimère, recrute le complexe dynéine/dynactine via la sous-unité p150(glued). Cette interaction permet le déplacement de la vésicule vers l'extrémité négative des microtubules (MT). Lorsque les concentrations en cholestérol de la membrane des vésicules est faible, le complexe est désassemblé. MTOC, microtubule-organizing center; ORP1L, oxysterol-related protein 1 L; RILP, Rab interacting lysosomal protein. D'après (Seaman, 2004).

III. 2. c. Maturation endosomale

Comme signalé précédemment dans la présentation du transport endosomal, la maturation des EE en LE grâce à la conversion Rab5/Rab7 a été décrite récemment.

Avant les années 2000, les outils techniques pour l'étude du transport intracellulaire (analyse sur cellules fixées, fractionnement subcellulaire et essais *in vitro*) ne permettaient pas de suivre de façon dynamique les endosomes. Le développement de la vidéo-microscopie et l'amélioration des techniques de transfection ont permis de visualiser en temps réel les endosomes et leurs protéines régulatrices. En utilisant ces nouveaux outils, l'équipe de M. Zerial a décrit pour la première fois le remplacement progressif de Rab5 à la membrane des EE par Rab7 pour permettre leur maturation en LE (Towbin et al., 1979). Dans cet article, les auteurs montrent que l'activation de Rab7 est coordonnée à l'inactivation de Rab5.

Le schéma qui découle de cette étude et des précédentes est le suivant (Figure 18) :

- Rabex-5, un GEF de Rab5, est recruté au niveau des EE et active Rab5 (Horiuchi et al., 1997).
- Cela déclenche le recrutement de Rabaptin-5 qui est un effecteur de Rab5. Le complexe trimérique (Rabaptin-5/Rabex-5/Rab5) forme une boucle d'auto-activation qui augmente l'activation de Rab5 (Lippe et al., 2001).
- Rab5 activé recrute en cascade ses effecteurs.

L'inactivation de Rab5 nécessite à la fois l'activité GTPasique de Rab5 catalysée par sa GAP et le blocage de la boucle de recrutement de Rab5.

En 2008, le passage entre Rab5 et Rab7 est modélisé (Del Conte-Zerial et al., 2008). Il apparaît que le phénomène est contrôlé par un « cut-out switch » : Rab5 active Rab7, qui va s'auto-activer mais aussi inhiber Rab5 en retour.

Le complexe protéique qui contrôle le « switch » Rab5/Rab7 a été décrit par Poteryaev et coll. (Poteryaev et al., 2010). Les auteurs ont identifié SAND-1/Mon1 comme régulateur de cette transition chez les Métazoaires. Ils ont ensuite confirmé que ce mécanisme semble conservé chez les Mammifères en reproduisant les résultats dans des cellules HeLa.

SAND-1/Mon1 et ccz1 forment un complexe qui se lie à Rab5. Cela bloque la boucle d'auto-activation de Rab5. Le complexe permet également de recruter Rab7 *via* l'activation du complexe HOPS et plus particulièrement Vps39, l'une de ses sous-unités.

La conversion Rab5/Rab7 est bloquée par la surexpression d'un mutant dominant négatif de Rab5, Rab5-Q79L, ou en inhibant Vps39 par ARN interférence (Towbin et al., 1979). Le fait

de bloquer la maturation des endosomes par l'expression d'un mutant dominant actif de Rab5 bloque la voie dégradative (Rosenfeld et al., 2001).

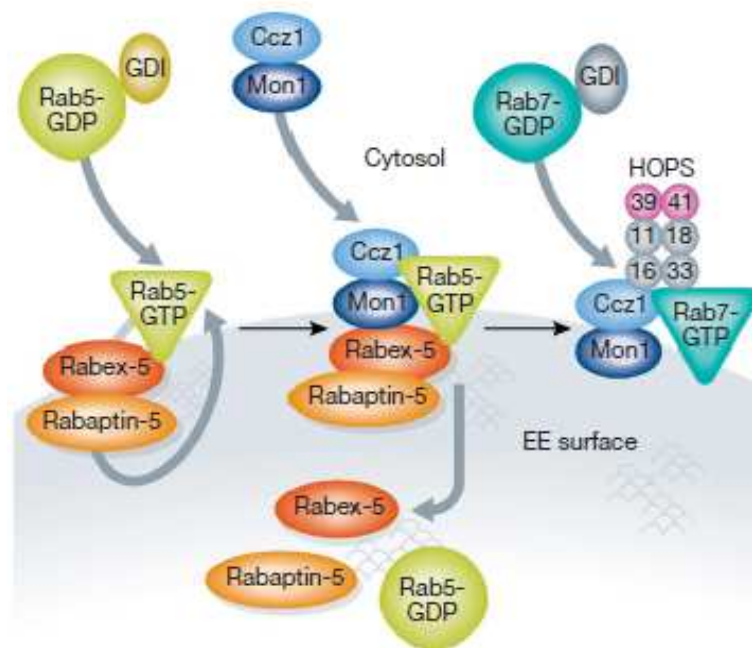


Figure 18 : Le « switch » Rab5/Rab7 pendant la maturation endosomale

A l'état initial Rab5 et Rab7 sont sous forme inactive liées au GDP dans le cytosol. Rab5 est recrutée à la membrane des endosomes précoces par Rabex-5. Rabaptin-5 est recruté. Le complexe s'auto-active. La transition vers les endosomes tardifs est initiée par le recrutement du complexe Mon1/SAND-1/ccz1. Ce complexe inactive Rab5 et recrute le complexe HOPS qui guide Rab7 pour sa fixation sur la membrane. GDI, GDP dissociation inhibitor; GDP, guanine diphosphate; GTP, guanine triphosphate; HOPS, homotypic fusion and protein sorting complex. D'après (Seaman, 2004).

Même si la maturation des endosomes commence à être très bien décrite, il faut garder à l'esprit que ces voies sont souvent étudiées dans un premier temps chez la Levure et qu'il peut exister des différences avec ce qui se passe chez l'Homme. Par exemple Vps39 qui se comporte comme un GEF pour Rab7 chez la Levure (Wurmser et al., 2000) ne semble pas avoir ce rôle chez le Mammifère (Peralta et al., 2010).

III. 2. d. Recrutement du complexe rétromère

Dès que Rab7 est active au niveau de la membrane des endosomes, elle peut permettre l'adressage de certains cargos directement vers le TGN.

C'est assez récemment que le rôle de Rab7 dans la régulation du complexe rétromère a été découvert. Deux études, utilisant des siRNAs et des mutants de Rab7, ont montré que Rab7 était nécessaire pour le recrutement de la sous-unité de reconnaissance (Vps35/Vps29/Vps26) du complexe rétromère (Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009).

III. 2. e. Pathologies associées aux mutations de Rab7

Une mutation ou une dysfonction de Rab7 provoque une altération du trafic cellulaire. Cela peut causer différents types de pathologies : maladies immunitaires, neuropathies, altérations du métabolisme lipidique ou cancers.

L'une des pathologies due à la mutation de Rab7 est la maladie de Charcot-Marie-Tooth 2 de type B (CMT2B, Charcot-Marie-Tooth type 2B). C'est une maladie génétique neurodégénérative touchant les neurones sensoriels et moteurs. Elle est caractérisée par une faiblesse musculaire plus ou moins sévère accompagnée d'atteintes viscérales et d'une susceptibilité augmentée aux infections (Verhoeven et al., 2003). La maladie est liée à plusieurs mutations faux-sens sur le gène codant pour Rab7. Ces mutations modifient le site de liaison de Rab7 avec le GTP et entraînent une activation incontrôlée de la Rab. Rab7 est donc retenue au niveau des membranes ce qui augmente l'interaction avec ses effecteurs. La mutation la plus répandue est la mutation L129F (McCray et al., 2010).

Pour les atteintes dues aux infections virales ou bactériennes, il est facile d'envisager que la voie de dégradation passant par Rab7, les pathogènes ne sont plus dégradés de façon aussi efficace et sont donc plus nocifs. Il est en revanche difficile d'expliquer pourquoi ces mutations de Rab7, qui est une protéine exprimée de façon ubiquitaire, conduisent à des atteintes ciblées des neurones. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

- l'existence d'une autre protéine Rab qui peut compenser l'effet de Rab7 mais qui n'est pas exprimée dans les neurones,
- le fait qu'un effecteur de Rab7 est en quantité limitante dans les neurones mais pas dans les autres types cellulaires (Mitra et al., 2011),
- les neurones étant des cellules longues pour lesquelles la polarisation est primordiale, elles sont peut-être plus sensibles aux variations de la distribution des protéines et des lipides.

Deux études séparées ont montré que dans les neurones de patients NPC, le transport des récepteurs à la neutrophine était perturbé (Deinhardt et al., 2006; Saxena et al., 2005).

L'atteinte neurologique pourrait donc aussi être expliquée par un déficit du transport de facteurs neurotrophiques.

III. 3. Rab9

C'est en étudiant le transport du MPR que Lombardi et coll. ont décrit pour la première fois le rôle de Rab9 dans le recyclage du MPR depuis les LE vers le TGN (Lombardi et al., 1993). Ils ont montré dans un premier temps que Rab9 était localisé majoritairement au niveau de la membrane des LE et colocalisait avec le MPR. En surexprimant dans leur modèle cellulaire un mutant de Rab9 incapable de lier le MPR, ils ont montré que celui-ci était bloqué dans les LE. La même équipe, au cours de différentes études, a décrit les protéines qui agissent avec Rab9 dans cette voie de transport : TIP47 (47-kDa tail interacting protein) (Carroll et al., 2001), p40 (Diaz et al., 1997), et mapmodulin (Itin et al., 1997).

Plus tard, grâce à la surexpression de différentes formes de Rab9 fluorescentes, l'existence de vésicules de transport Rab9-positives qui fusionnaient avec le TGN ont été mises en évidence par vidéo-microscopie (Barbero et al., 2002).

Lorsque Rab9 est surexprimé dans des fibroblastes NPC, il y a réversion du phénotype d'accumulation des lipides (Choudhury et al., 2002; Walter et al., 2003). Des résultats identiques ont été observés lorsque Rab4, Rab7 ou Rab8 sont surexprimées dans des modèles cellulaires équivalents (Linder et al., 2007). Il a également été montré que le transport du cholestérol peut être rétabli par la surexpression de Rab9 dans des modèles de neurones NPC murins (Narita et al., 2005). Ces résultats ont ensuite été confirmés *in vivo* dans des modèles de souris transgéniques. Lorsque des souris NPC sont croisées avec des souches surexprimant Rab9, la survie des animaux a pu être augmentée de 22% (Kaptzan et al., 2009). Sur le plan cellulaire, l'accumulation de lipides dans les tissus nerveux est réduite de façon significative.

III. 4. Les SNARE, des effecteurs indispensables

Parmi les protéines effectrices des Rab, les SNARE sont les protéines impliquées dans la fusion des vésicules avec les membranes cibles (Jahn and Grubmuller, 2002). Elles

assurent conjointement avec les facteurs d'arrimage et les Rab, la spécificité directionnelle de chaque étape de transport. Elles se caractérisent par la présence dans leur structure d'un domaine baptisé « motif SNARE » très conservé au cours de l'évolution et d'un domaine transmembranaire. Aujourd'hui une trentaine de SNARE a été décrite chez les Mammifères dont, pour certaines, le rôle reste encore inconnu (Jahn and Scheller, 2006).

Les protéines SNARE ont dans un premier temps été classées en deux groupes selon leur localisation : les v-SNARE (vesicle SNARE) situées sur les vésicules et les t-SNARE (target SNARE) localisées au niveau des membranes cibles. Puis, après avoir mieux élucidé la structure de ces protéines, ont été distinguées les Q-SNARE ou les R-SNARE en fonction de la présence respective d'une glutamine ou d'une arginine dans le domaine SNARE. En général, les v-SNARE sont des R-SNARE, alors que les t-SNARE sont des Q-SNARE. Les Q-SNARE sont subdivisées en Qa, Qb et Qc SNARE en fonction de la place occupée dans le complexe SNARE lors de la fusion membranaire (Ungermann and Langosch, 2005).

Les R-SNARE sont incorporées dans la membrane des vésicules de transport au moment du bourgeonnement de celles-ci. Après arrimage de la vésicule, les R-SNARE forment avec les SNARE Qa, Qb et Qc présentes au niveau de la membrane du compartiment accepteur un complexe *trans*-SNARE, en tresse d'hélices α . Les motifs SNARE des différents éléments du complexe s'associent spontanément entre eux en s'enroulant les uns autour des autres. L'énergie libérée au cours de ce changement conformationnel permet d'initier le phénomène de fusion des membranes (Cai et al., 2007). Après la fusion, le complexe SNARE, appelé désormais *cis*-SNARE, se dissocie sous l'action de l'ATPase NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) et de son cofacteur SNAP (soluble NSF attachment protein). Les R-SNARE, à nouveau libres, sont alors recyclées jusqu'au compartiment donneur pour un nouveau cycle de transport vésiculaire (Figure 19) (Jahn and Scheller, 2006).

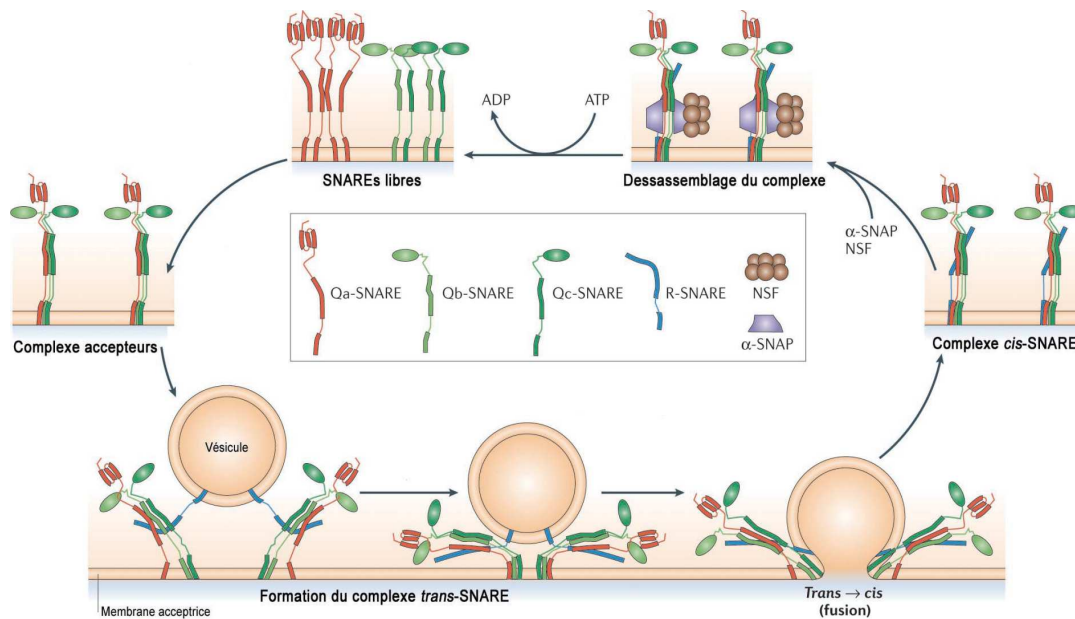


Figure 19 : Le cycle des SNARE au cours du transport vésiculaire

Trois Q-SNARE situées au niveau de la membrane du compartiment accepteur interagissent avec la R-SNARE de la vésicule de transport donnant un complexe *trans*-SNARE. Les motifs SNARE se replient et rapprochent les membranes afin d'initier leur fusion. Le complexe *cis*-SNARE est désassemblé par l'action de NSF et SNAP en présence d'énergie. Les SNARE peuvent être réutilisées pour un autre cycle de transport. ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; SNAP, soluble NSF attachment protein; SNARE, SNAP receptor; NSF, N-ethylmaleimide sensitive factor. D'après (Jahn and Scheller, 2006).

Chaque complexe SNARE identifié peut être associé à une étape de fusion membranaire. Il reste cependant un certain nombre d'étapes de fusion pour lesquelles aucun complexe SNARE n'a encore été attribué. Par ailleurs, seules certaines associations entre R-SNARE et Q-SNARE sont possibles *in vivo*. Les SNARE participent ainsi au phénomène de reconnaissance spécifique entre une vésicule donnée et son compartiment accepteur (Jahn and Scheller, 2006). La nature de la R-SNARE incorporée dans la membrane de la vésicule de transport au moment de sa formation détermine donc en grande partie sa destination finale.

Parmi les complexes SNARE identifiés, on peut citer l'association de la STX7, de la STX8, de Vti1b et de VAMP8 qui permet la fusion homotypique des LE, alors que le complexe formé par STX7, STX8, Vti1b et VAMP7 contrôle la fusion hétérotypique des LE avec les lysosomes (Pryor et al., 2004).

STX6 est localisée à la membrane du TGN et des EE. Elle participe au transport rétrograde entre les EE et le TGN au sein du complexe SNARE associant STX6, STX16, Vti1a ainsi que VAMP4 ou VAMP3 (Mallard et al., 2002).

IV. La régulation de l'homéostasie du cholestérol

En plus d'être le siège de la synthèse endogène du cholestérol, le RE est le compartiment où a lieu le contrôle de son homéostasie. Cela est possible grâce aux faibles concentrations en cholestérol des membranes du RE rendant leurs variations plus facilement détectables (Radhakrishnan et al., 2008). Plusieurs acteurs et niveaux de régulation sont mis en action de façon coordonnée pour contrôler les différentes étapes du métabolisme du cholestérol. Parmi les différents systèmes de rétrocontrôle mis en place par la cellule, celui contrôlant la synthèse endogène du cholestérol est unique. En effet, cette régulation est exercée par le cholestérol lui-même alors qu'il est entièrement séquestré dans les membranes.

IV. 1. Le complexe SREBP/SCAP

Les sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) sont des facteurs de transcription. Ils ont été mis en évidence par M.S. Brown et J.L. Goldstein au début des années 1990 et régulent un nombre important de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Il existe trois isoformes différentes de SREBP : SREBP-2 qui contrôle principalement les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, alors que SREBP-1c régule l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras (Horton, 2002). SREBP-1a peut agir sur de nombreux gènes et régule la synthèse du cholestérol, des acides gras et des triglycérides.

Dans les cellules CHO, les cellules HeLa et les fibroblastes humains, les trois isoformes de SREBP sont exprimées (Yang et al., 1995). Chez l'Homme, il existe des variations d'expression importantes des SREBP selon le tissu considéré et les besoins cellulaires. SREBP-1c par exemple est plus exprimé que SREBP-1a dans le foie, le tissu adipeux, le cerveau et les glandes surrénales (Shimomura et al., 1997). Il a également été montré que SREBP-1c est nécessaire pour la différenciation adipocytaire (Kim and Spiegelman, 1996). En revanche, SREBP-1a est exprimé de façon importante dans les cellules immunitaires (Jeon and Osborne, 2012).

Tous les gènes cibles des SREBP possèdent des séquences SRE (sterol-responsive element) dans leurs régions promotrices à laquelle le facteur de transcription se fixe pour moduler la transcription du gène. SREBP-2 régule les gènes codant pour Cla-1 (Treguier et

al., 2004), LDL-R ainsi que de la plupart des enzymes impliquées dans la synthèse endogène du cholestérol (Horton, 2002).

Les SREBP sont synthétisées dans le RE et localisées sous la forme de précurseurs dans sa membrane. Elles agissent au sein d'un complexe formé avec la SCAP (SREBP cleavage-activating protein). La SCAP possède un domaine SSD qui lui permet de réagir aux concentrations en cholestérol en changeant de conformation (Radhakrishnan et al., 2004). La présence de cholestérol au niveau des membranes du RE entraîne la fixation du complexe SREBP/SCAP *via* la SCAP à INSIG (insulin induced gene) ayant pour conséquence la rétention du complexe dans le RE (McPherson and Gauthier, 2004) (Figure 20, partie gauche).

Au contraire, lorsque les concentrations en stérols intracellulaires sont faibles, la conformation de la SCAP permet le détachement du complexe SREBP/SCAP d'INSIG. Cet événement déclenche alors l'ordre de sortie du complexe du RE et son incorporation dans des vésicules recouvertes de COPII (coat protein II). Les vésicules sont adressées au Golgi où la partie NH₂-terminale des SREBP est clivée par l'action séquentielle de deux protéases S1P et S2P (Figure 20, partie droite). La forme active de SREBP, qui porte l'activité transcriptionnelle, gagne le noyau pour exercer son rôle sur les gènes cibles.

La réponse cellulaire provoquée par l'activation de SREBP-2 est :

- l'augmentation de la capture des LDL en favorisant l'expression des LDL-R,
- et l'accélération de la synthèse endogène du cholestérol en augmentant notamment l'expression de l'HMGCoAR (Libby et al., 2000).
- SREBP-2 autorégule sa synthèse (Sheng et al., 1995) et augmente donc sa transcription.

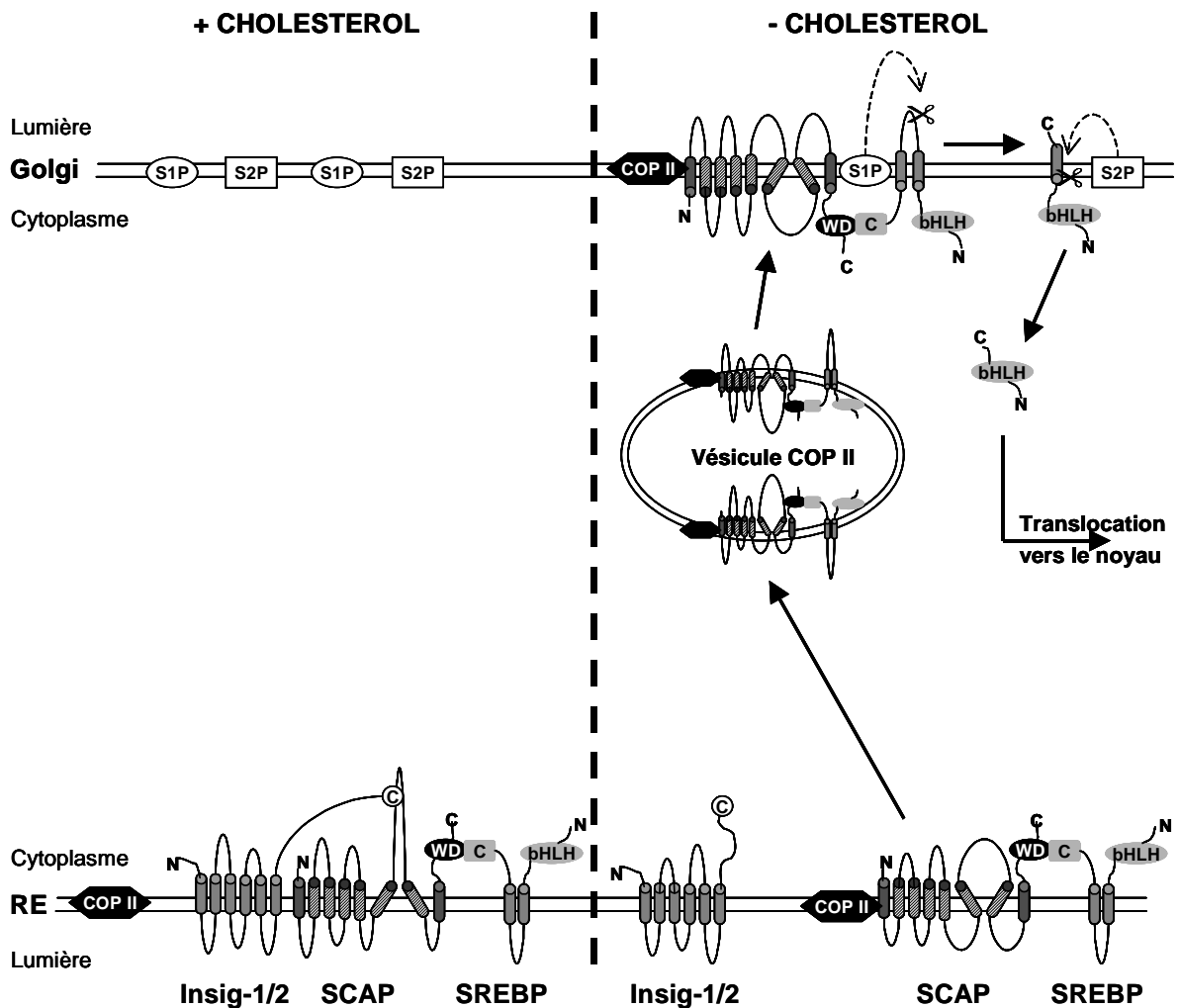


Figure 20 : Mécanisme d'activation des SREBP

En présence de cholestérol, le complexe SREBP/SCAP est retenu à la membrane du RE par Insig. En absence de cholestérol, Insig se détache du complexe et permet à celui-ci de se lier aux COPII. Le complexe est alors transporté jusqu'au Golgi où la SREBP est activée par une cascade protéolytique. La séquence NH_2 -terminale active est transloquée dans le noyau. bHLH, basic helix-loop-helix leucine zipper; COP II, coat protein II; Insig, insulin induced gene; RE, réticulum endoplasmique; S1P, site-1 protease ; S2P, site-2 protease; WD, WD repeat domain. D'après (McPherson and Gauthier, 2004).

Dans le noyau, les SREBP sont ubiquitinylées pour être dégradées par le protéasome (Hirano et al., 2001). Cette dégradation rapide a pour but d'éviter une accumulation nucléaire de la forme active des SREBP afin d'assurer une régulation fine de l'homéostasie cellulaire des lipides.

Deux mécanismes distincts mais convergents existent pour contrôler la régulation transcriptionnelle des gènes en fonction de la classe de stérols considérée (Figure 21). Le

cholestérol en se fixant à la SCAP entraîne sa liaison à INSIG, alors que les oxystérols en se liant à INSIG entraînent la fixation de ce dernier à la SCAP (Radhakrishnan et al., 2007). Dans les deux cas, l'événement qui en découle est un changement de conformation de la SCAP qui empêche la liaison avec les protéines de COPII (Sun et al., 2007).

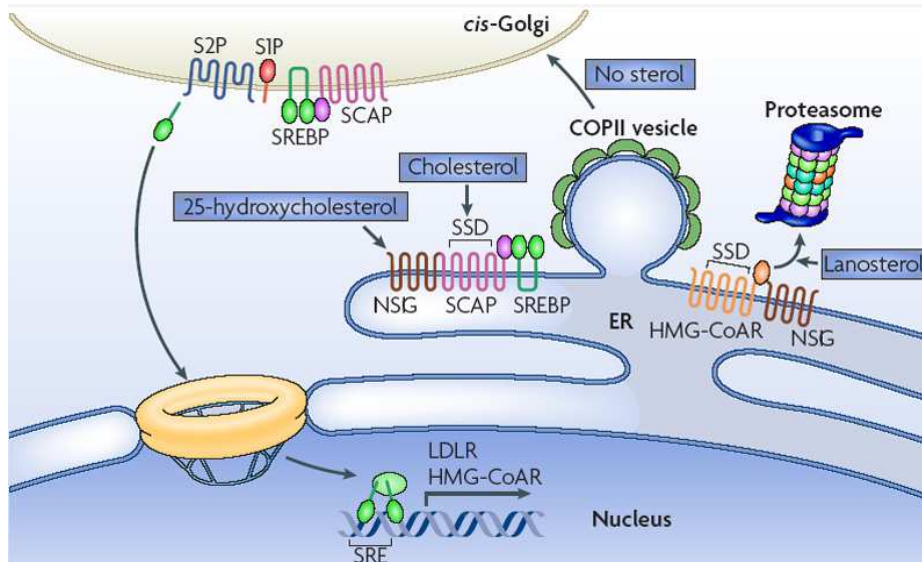


Figure 21 : Différents niveaux de régulation du métabolisme du cholestérol au niveau du réticulum endoplasmique

En présence de stérols, Insig (insulin induced gene) empêche le complexe SREBP/SCAP de se lier aux vésicules COPII (coat protein II). Le transport de SREBP dans ces vésicules jusqu'au Golgi est nécessaire pour l'activation catalytique du facteur de transcription. Une fois SREBP libéré, il agit dans le noyau où il active les gènes stérols-dépendants. L'HMGCoAR (3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A) est aussi régulée par les stérols au niveau post-transcriptionnel, via la fixation de Insig qui entraîne sa dégradation par le protéasome. ER, endoplasmic reticulum; LDL-R, LDL receptor; S1P, site-1 protease; S2P, site-2 protease; SCAP, SREBP-cleavage activating protein; SREBP, sterol regulatory element binding protein; SSD, sterol sensing domain; SRE, sterol response element. D'après (Ikonen, 2008).

En accord avec leurs rôles respectifs dans la synthèse des acides gras et du cholestérol, SREBP-1c et SREBP-2 sont régulés différemment selon les besoins cellulaires. En plus des régulations décrites ci-dessus, SREBP-1c pourrait être régulé par d'autres facteurs tels que des facteurs nucléaires, les acides gras polyinsaturés, l'insuline et le glucagon (Horton et al., 2002). Ces données sont intéressantes car elles mettent en évidence les interactions qui existent entre les différentes voies du métabolisme cellulaire au sein des tissus qui jouent un rôle important dans l'homéostasie des lipides tel que le foie.

IV. 2. L'HMGC_oA réductase

Cette enzyme est l'enzyme limitante de la voie de synthèse endogène du cholestérol. Etant donné son importance, elle est régulée à plusieurs niveaux. Tout d'abord, l'activité de l'HMGC_oAR est régulée de façon allostérique par la disponibilité en HMGC_oA. L'expression de l'HMGC_oAR est contrôlée par le complexe SREBP/SCAP. Ainsi, lorsque les concentrations intracellulaires en cholestérol sont faibles, la transcription du gène codant pour l'HMGC_oAR est stimulée, augmentant en conséquence la néosynthèse du cholestérol (Libby et al., 2000). Il existe enfin un dernier niveau de régulation qui concerne la demi-vie de la protéine. Lorsque les stérols s'accumulent dans la cellule, l'HMGC_oAR est rapidement dégradée (demi-vie <1h au lieu de 12 h en absence de stérol). Singulièrement, le cholestérol est un faible inducteur de cette dégradation. Son précurseur, le lanostérol est beaucoup plus puissant. Lorsque ce dernier s'accumule, il induit la liaison d'INSIG à l'HMGC_oAR favorisant sa dégradation par le protéasome après ubiquitination (Song et al., 2005) (Figure 21).

IV. 3. L'ACAT1 et l'hydrolase neutre des esters de cholestérol

Outre l'HMGC_oAR et le complexe SREBP/SCAP, les membranes du RE renferment d'autres enzymes intervenant dans des étapes de transformation du cholestérol. Parmi elles, l'ACAT1 (acyl-Coenzyme A:cholesterolacyl transferase 1) permet l'estérification du cholestérol.

L'ACAT1 est exprimée dans de nombreux types cellulaires. Elle utilise le cholestérol libre dérivé de l'endocytose des LDL ou provenant de la membrane plasmique qu'elle couple aux acides gras à longues chaînes pour former des EC (Chang et al., 2001). L'estérification du cholestérol diminue encore sa solubilité rendant plus difficile son insertion dans les membranes. Les EC formés sont libérés dans la lumière du RE puis stockés dans des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques permettant à la cellule de maintenir une concentration basse de cholestérol au sein du RE. Cette transformation joue un rôle protecteur pour la cellule car les EC sont moins cytotoxiques que le cholestérol libre (Tabas, 2002).

Dans de nombreux articles, l'estérification du cholestérol par l'ACAT1 est utilisée comme témoin de l'arrivée du cholestérol libre au niveau des membranes du RE (Du et al., 2012; Urano et al., 2008). En effet, l'ACAT1 est majoritairement exprimée au niveau du RE et son activité est régulée de façon allostérique par la disponibilité en cholestérol (Chang et al., 2001).

Il existe une deuxième isoforme de l'ACAT, l'ACAT2. Celle-ci est principalement présente dans les hépatocytes et les entérocytes. Elle est impliquée dans l'absorption des lipides et dans la formation des VLDL et des CM (Chang et al., 2001).

Le cholestérol est constamment en équilibre entre la forme estérifiée de stockage et la forme libre pouvant être intégrée dans les membranes cellulaires ou effluée vers les accepteurs plasmatiques. La synthèse et l'hydrolyse des EC forment un cycle continu décrit dès 1980 par Brown et coll. (Brown et al., 1980).

Il est communément admis que l'hydrolyse des EC contenus dans les gouttelettes lipidiques a lieu dans le cytoplasme grâce à l'action d'hydrolases neutres, les nCEH (neutral cholesterol ester hydrolases). Il en existe plusieurs formes selon le type cellulaire mais toutes sont cytoplasmiques. Dans les macrophages, il a été décrit 3 formes différentes (Igarashi et al., 2010). Parmi elles, le rôle de la NCEH serait prévalent (Okazaki et al., 2008).

IV. 4. Les oxystérols

A l'inverse de l'estérification par l'ACAT1, l'oxydation du cholestérol par des enzymes spécialisées ou par auto-oxydation rend les stérols plus hydrophiles. Ils diffusent plus librement dans l'environnement cytoplasmique, voire vers l'extérieur de la cellule et se comportent comme des seconds messagers lipidiques.

Le 24S- et le 27-hydroxycholestérol sont les oxystérols retrouvés en plus grande quantité dans le sang et les organes (Souidi et al., 2004). Le 24S-hydroxycholestérol est produit essentiellement dans les neurones au niveau du RE. Dans les macrophages, le 27-hydroxycholestérol est la forme la plus répandue des oxystérols. Ces oxystérols peuvent se lier à INSIG et maintenir les SREBP à l'état inactivé (Adams et al., 2004) (Figure 21). A l'opposé, ils sont capables d'activer l'ACAT1 afin d'augmenter le stockage du cholestérol sous forme d'esters (Lange et al., 1999). *Via* leur liaison aux facteurs nucléaires, les oxystérols peuvent réguler l'expression de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol (voir le chapitre IV. 5.).

IV. 5. Les facteurs nucléaires

Les facteurs nucléaires sont d'autres facteurs de transcription impliqués dans le contrôle du métabolisme du cholestérol. Il en existe deux types les liver X receptors (LXRs) et les peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). Leur point commun est de moduler l'expression de gènes cibles en réponse à la liaison des stérols (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2009).

IV. 5. a. Les liver X receptors (LXRs)

Les LXRs sont des récepteurs nucléaires sensibles aux variations de la concentration intracellulaire en stérols. Leur fonction est de réguler l'homéostasie du cholestérol en agissant sous forme de facteurs de transcription (après hétérodimérisation avec les RXRs (retinoid X receptors)) sur une série de gènes impliqués dans la synthèse, l'absorption et l'efflux du cholestérol (Souidi et al., 2004). L'activation des deux formes du LXR (α et β) facilite le TIC par différents mécanismes (Figure 22) :

- en augmentant l'expression des transporteurs ABC (ATP binding cassette),
- en redistribuant l'ABCA1 (ATP binding cassette transporter A1) à la membrane plasmique où il est actif,
- en augmentant l'expression de l'apo E et
- en stimulant la mobilisation du cholestérol vers la membrane plasmique (Baranowski, 2008).

Dans les macrophages activés, la forme LXR α est la forme dominante.

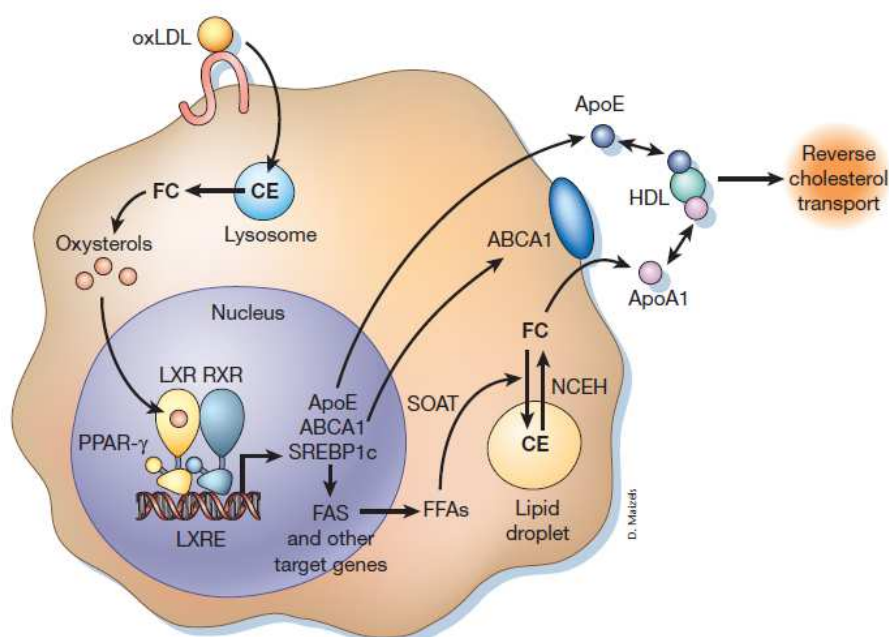


Figure 22 : Effets protecteurs de l'activation du complexe LXR/RXR par les oxystérols

Les oxystérols activent le complexe LXR/RXR (liver X receptor/retinoid X receptor) qui stimule l'expression des gènes cibles : ApoE, ABCA1, SREBP1c ainsi que d'autres gènes dont FAS (fatty acid synthase). Cela va d'une part, favoriser l'efflux du cholestérol aux accepteurs extracellulaires mais aussi d'autre part, produire des FFAs (free fatty acids) pour permettre l'estérification du cholestérol libre. Les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) stimulent l'efflux en induisant l'expression du LXR α . CE, cholesterol ester; FC, free cholesterol; LXRE, LXR response element; NCEH, neutral cholesterol ester hydrolase; SOAT, sterol O-acyltransferase. D'après (Li and Glass, 2002).

IV. 5. b. Les peroxisomeproliferator-activatedreceptors (PPARs)

Les PPARs sont des récepteurs nucléaires qui lient les lipides. Ils agissent comme des facteurs de transcription et contrôlent le métabolisme des lipides et du glucose (Lalloyer and Staels, 2010). Trois types de PPARs ont été identifiés : α , γ , et β - δ .

Les PPARs activent la transcription de leurs gènes cibles en formant un hétérodimère avec les RXRs. Le complexe se fixe sur une séquence spécifique des gènes cibles appelée PPRE (peroxisome proliferator response element). Les récepteurs PPAR α sont exprimés dans de nombreux types cellulaires. Ils sont particulièrement exprimés dans les cellules constituant la plaque d'athérome où leur activation produit un effet antiathérogène : limitation de l'adhésion des macrophages aux parois vasculaires, inhibition de leur recrutement, diminution de l'inflammation et de la prolifération des cellules musculaires lisses, promotion de l'efflux du cholestérol *via* l'ABCA1 et Cla-1 dans les macrophages (Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2009). Les PPARs de type γ peuvent être séparés en trois sous-types : γ 1, γ 2 et γ 3. La forme γ 1 est exprimée de façon ubiquitaire mais les formes γ 2 et γ 3 sont exprimées principalement dans le tissu adipeux. Les PPAR γ 3 sont également fortement exprimés dans les macrophages (Fajas et al., 1998). Les PPAR γ sont activés par des molécules lipophiles telles des dérivés des acides gras ou des lipides issus des LDL oxydées. Le type β - δ est principalement exprimé dans le cerveau, le tissu adipeux et la peau.

Le potentiel thérapeutique des PPARs et de leurs agonistes dans le traitement des dyslipidémies et du diabète de type 2 en ont fait des sujets majeurs de recherche ce qui a permis de mieux décrire les mécanismes d'action et de régulation des PPARs.

V. Le stockage et l'efflux du cholestérol

V. 1. Le stockage

Si les mécanismes de régulation précédemment décrits n'ont pas suffi à réduire les concentrations intracellulaires de cholestérol, le cholestérol en excès provenant de la synthèse endogène ou de l'endocytose des LDL est stocké sous forme d'EC dans les gouttelettes lipidiques. Le mécanisme de formation des gouttelettes est encore incertain mais le modèle actuel est qu'elles sont formées par bourgeonnement à partir du RE où les EC sont synthétisés par l'ACAT1 (Martin et al., 2005).

Les gouttelettes lipidiques sont composées d'un cœur lipidique neutre (EC et triglycérides) entouré d'une membrane monocouche de lipides amphiphiles (phospholipides et cholestérol) (Figure 23). Des protéines sont enchâssées dans cette membrane. Certaines sont des protéines structurales, d'autres permettent de réguler les interactions avec le milieu environnant. L'origine de ces protéines est variée: membrane plasmique, RE, ou protéines adressées spécifiquement à la gouttelette par des modifications post-traductionnelles (Krahmer et al., 2009). Les protéines de la famille PAT (protein family including perilipin, adipophilin, S3-12, and IIP47) sont spécifiquement exprimées à la surface des gouttelettes lipidiques.

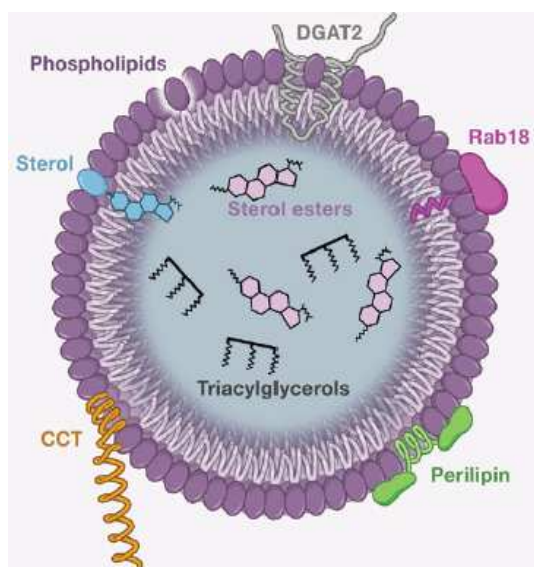


Figure 23 : Organisation structurale d'une gouttelette lipidique

Le cœur de la gouttelette est composé d'esters de cholestérol et de triglycérides. La membrane est une monocouche constituée de phospholipides et de cholestérol dans laquelle des protéines sont insérées. CCT, CTP:phosphocholinecytidyl transférase; DGAT2, diacylgcérolacyl transférase 2. D'après (Krahmer et al., 2009).

L'accumulation de ces gouttelettes est un marqueur de l'engorgement des cellules en lipides retrouvé dans l'athérosclérose, l'obésité ou le diabète de type 2. Dans le cas de l'athérosclérose, les macrophages spumeux contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques (Shashkin et al., 2005).

Les gouttelettes lipidiques sont des organelles dynamiques dont les lipides peuvent être mobilisés par la cellule. Les mécanismes régulant la mobilisation du cholestérol contenu dans les gouttelettes lipidiques sont encore peu connus. Cependant, Zhao et coll. ont mis en évidence le rôle primordial de l'hydrolase neutre des EC qui, lorsqu'elle est surexprimée, permet de promouvoir l'efflux passif et actif du cholestérol *in vivo* (Zhao et al., 2007).

Les gouttelettes étant des vésicules avec une membrane monocouche, elles ne peuvent pas fusionner directement avec les lysosomes pour la dégradation des EC. Très récemment, il a été décrit une voie qui met en jeu les LAL et permet à la cellule de mobiliser les EC des gouttelettes lipidiques. Les gouttelettes lipidiques sont internalisées dans des autophagosomes qui hydrolysent leurs EC. Cette nouvelle voie a été mise en évidence dans des macrophages de moelle osseuse et du péritoine de souris. Le cholestérol libéré est principalement utilisé pour être efflué par l'ABCA1 (Ouimet et al., 2011; Singh et al., 2009). La cavéoline ou les protéines START pourraient aussi être impliquées dans la mobilisation du cholestérol depuis les gouttelettes lipidiques (van Meer, 2001).

La Rab GTPase Rab18 est spécifiquement exprimée à la surface des gouttelettes lipidiques (Figure 15). Son rôle n'est pas encore bien défini cependant plusieurs équipes ont montré que Rab18 est retrouvée à la membrane de gouttelettes lors de la stimulation de la lipolyse et pourrait donc participer à la mobilisation des lipides (Martin et al., 2005; Ozeki et al., 2005).

V. 2. L'efflux

L'efflux est un élément critique pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol. Les cellules périphériques peuvent stocker mais ne peuvent dégrader le cholestérol, il leur faut donc le céder à d'autres capables de l'éliminer. Pour cela les cellules périphériques transfèrent le cholestérol aux lipoprotéines qui vont le transporter jusqu'au foie pour son excrétion ou vers les tissus stéroïdogènes pour sa réutilisation. C'est le TIC (Rader et al., 2009). La sortie du cholestérol de la cellule ou efflux est la première étape de ce transport.

L'efflux du cholestérol est particulièrement important pour les macrophages impliqués dans la formation de la plaque d'athérosclérose car il permet de s'opposer à la formation des cellules spumeuses.

Seul le cholestérol libre présent au niveau de la membrane plasmique peut être capté par les accepteurs plasmatiques. Le cholestérol, quelle que soit son origine, doit donc être sous forme libre et adressé à la membrane plasmique pour être efflué. Il existe un équilibre entre l'activité de l'ACAT1 et l'efflux. *In vitro*, si les cellules sont incubées avec des accepteurs plasmatiques, l'activité ACAT1 est réduite. A l'inverse si l'activité ACAT1 est bloquée, la disponibilité du cholestérol pour l'efflux est augmentée (Chang et al., 2006).

L'efflux du cholestérol est un mécanisme complexe pouvant utiliser plusieurs voies en fonction du type cellulaire, de l'état métabolique de la cellule et de la nature de l'accepteur.

Les différentes voies de l'efflux du cholestérol sont :

- la diffusion passive du cholestérol à partir des rafts ou des cavéoles vers les accepteurs du milieu extracellulaire (HDL ou LDL),
- l'efflux actif médié par les récepteurs Cla-1,
- et l'efflux actif *via* les transporteurs ABC (Yokoyama, 2006).

Le récepteur Cla-1, analogue humain du SR-B1 murin, est localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules et possède la capacité de transporter le cholestérol de façon bidirectionnelle (de La Llera-Moya et al., 2001). Son expression est régulée par l'activation de SREBP-2 et la présence d'agonistes du LXR (Larrede et al., 2009). Au niveau de la membrane plasmique, Cla-1 est retrouvé associé aux cavéoles. Cette localisation préférentielle permettrait à Cla-1 de promouvoir l'efflux du cholestérol *via* les HDL (Fielding and Fielding, 2001).

Les transporteurs ABC constituent une superfamille de protéines au sein de laquelle on distingue 7 familles classées de A à G (Dean et al., 2001). Chez les eucaryotes, ils sont des régulateurs clés de l'efflux du cholestérol. Ils sont exprimés à la surface des macrophages ainsi que d'autres types de cellules (Oram and Vaughan, 2006).

Seul le cholestérol libre peut être pris en charge par ces transporteurs. Ce cholestérol peut avoir plusieurs origines : la membrane plasmique, le Golgi, les gouttelettes lipidiques, le compartiment de recyclage ou encore le compartiment endolysosomal. Le cholestérol membranaire étant directement disponible pour les transporteurs, il est utilisé en première intention puis le cholestérol est mobilisé depuis les compartiments intracellulaires. Une

déplétion en lipides de la membrane plasmique déclenche une cascade de signalisation intracellulaire afin de mobiliser le cholestérol contenu dans les LE et les lysosomes (Schmitz and Grandl, 2009).

Les transporteurs ABC possèdent une activité ATPasique qui permet de fournir l'énergie nécessaire au transfert du cholestérol vers les accepteurs extracellulaires. Deux types majoritaires de transporteurs, les ABCA1 et les ABCG1 (ATP binding cassette transporter G1) ont été identifiés comme permettant l'efflux du cholestérol des macrophages vers les lipoprotéines de la famille des HDL. Chaque type de transporteur a un accepteur préférentiel (Figure 24).

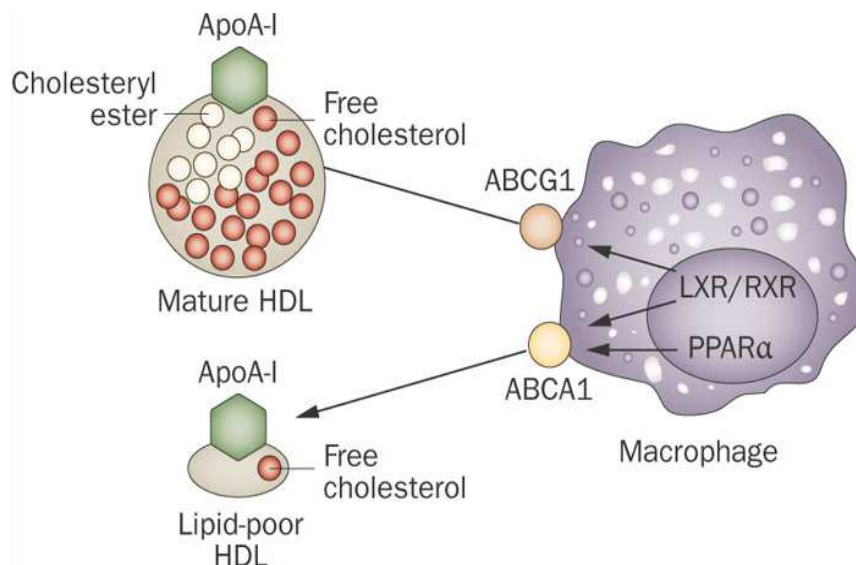


Figure 24 : Rôle d'ABCA1 et ABCG1 dans l'efflux du cholestérol des macrophages

Le cholestérol libre est transféré aux pré-β HDL par l'ABCA1 (ATP binding cassette transporter A1) alors que les HDL matures reçoivent le cholestérol via l'ABCG1 (ATP binding cassette transporter G1). Les récepteurs nucléaires LXR/RXR (liver X receptor/retinoid X receptor) régulent l'expression des deux types de transporteurs. Les récepteurs PPARα (peroxisome proliferator-activated receptor α) régulent l'expression de l'ABCA1. HDL, High density lipoprotein. D'après (Duffy and Rader, 2009).

V. 2. a. L'efflux médié par l'ABCA1

L'ABCA1 a la capacité de transférer des lipides à l'apo AI. La fixation d'apo AI libre ou pauvre en lipides à l'ABCA1 déclenche un transfert du cholestérol libre et des phospholipides membranaires vers l'apo AI qui se transforme alors en pré-β HDL (Smith et al., 2004). C'est

la lipodation de l'Apo A1. Les pré- β HDL ou « HDL naissantes » sont des petites particules discoïdales composées de phospholipides, de cholestérol et d'apo.

Initialement, la protéine ABCA1 a été localisée au niveau de la membrane plasmique où elle réalise la lipodation de l'apo. Mais elle est aussi retrouvée à la membrane de nombreux compartiments intracellulaires dont les LE et les lysosomes, où elle permet de mobiliser le cholestérol pour son efflux (Neufeld et al., 2004). Chen et coll. ont évalué qu'environ 50% du cholestérol mobilisé par l'ABCA1 proviennent des compartiments intracellulaires (Chen et al., 2005). Ces résultats mettent en évidence le rôle de l'ABCA1 dans la mobilisation du cholestérol provenant des compartiments intracellulaires mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien compris.

En conditions physiologiques, la sortie du cholestérol du compartiment endolysosomal reste dépendante de protéines transporteuses du cholestérol. En effet, NPC-1 est indispensable pour cette étape (Schmitz and Grandl, 2009) et l'équipe de A. Graham a montré que la surexpression de MLN64 dans des macrophages induit une augmentation significative de l'efflux du cholestérol à l'apo A1 (Borthwick et al., 2010).

L'ABCA1, dont l'expression est ubiquitaire, est très fortement exprimé dans le foie et les macrophages (Kielar et al., 2001). L'expression d'ABCA1 est régulée par les concentrations intracellulaires en lipides. Lorsque des HMDM (human monocyte-derived macrophages) sont surchargés avec des LDL modifiées, la quantité d'ARN messagers (ARNm) d'ABCA1 est multipliée par 4 *in vitro* (Larrede et al., 2009). La régulation de l'expression d'ABCA1 s'effectue tant au niveau transcriptionnel par le complexe LXR/RXR et les récepteurs PPAR α qu'au niveau post-traductionnel (Chinetti et al., 2001; Costet et al., 2000).

L'importance de l'ABCA1 dans l'efflux du cholestérol est illustrée chez les patients souffrant de la maladie de Tangier, maladie génétique rare, causée par des mutations du gène codant pour la protéine ABCA1. Ces mutations causent une déficience sévère en HDL, une accumulation du cholestérol dans les tissus périphériques et un risque augmenté d'athérosclérose (Oram, 2002).

V. 2. b. L'efflux médié par l'ABCG1

L'autre transporteur important pour l'efflux du cholestérol est l'ABCG1, qui a pour accepteur préférentiel les HDL matures (Kennedy et al., 2005). Il est actif à la membrane cellulaire où il transfère du cholestérol et des phospholipides aux HDL qui ont été formées par l'action de l'ABCA1. Il est aussi capable de transférer des oxystérols dont le 7-

kétocholestérol, principal composant des LDL oxydées (Terasaka et al., 2007). L'expression de l'ABCG1 est régulée par les concentrations intracellulaires en lipides, ainsi il est plus exprimé dans les cellules spumeuses que dans les macrophages (Lorkowski et al., 2001). Lorsque des HMDM surchargés sont stimulés avec des agonistes du LXR, le niveau d'expression des ARNm de l'ABCG1 est très fortement augmenté (de l'ordre de 8 fois). Cependant, dans ces conditions, la participation de l'ABCG1 dans l'efflux vers les HDL reste toutefois minoritaire (Larrede et al., 2009).

Il existe de nombreux arguments de la littérature en faveur d'une coopération entre les transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Tall, 2008; Vaughan and Oram, 2006). En effet, l'action de l'ABCA1 permet de former des HDL naissantes qui constituent d'excellents accepteurs du cholestérol efflué par l'ABCG1. De plus, l'inhibition simultanée de l'ABCA1 et de l'ABCG1 dans des modèles murins provoque une abolition totale de l'efflux actif du cholestérol. Cela entraîne la formation de nombreuses cellules spumeuses dans les tissus et une forte susceptibilité à l'athérosclérose (Yvan-Charvet et al., 2007).

De façon surprenante, même si l'ABCA1 a pour accepteur préférentiel l'apo AI, l'efflux vers les HDL serait aussi possible. L'hypothèse proposée pour expliquer cette observation est que l'ABCA1 pourrait modifier les HDL afin de pouvoir leur transférer du cholestérol (Larrede et al., 2009).

Outre ces acteurs majeurs de l'efflux du cholestérol depuis les macrophages, d'autres voies pourraient permettre la sortie du cholestérol notamment celle de l'apo E (Masson and Yvan-Charvet, 2008).

Après la sortie du cholestérol des cellules périphériques, celui-ci est transporté en partie par les HDL jusqu'aux tissus stéroïdogènes ou jusqu'au foie. Parce qu'elles transportent le cholestérol vers le lieu de son élimination ou de sa transformation, les HDL sont considérées comme antiathérogènes (Cuchel and Rader, 2006). De nombreux articles démontrent l'intérêt thérapeutique de stimuler le TIC *via* l'augmentation des concentrations plasmatiques de HDL : (Duffy and Rader, 2009; Linsel-Nitschke and Tall, 2005; Masson and Yvan-Charvet, 2008)...

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

Le cholestérol est un élément primordial pour la survie des cellules et c'est pour cela qu'il existe, à l'échelle de l'organisme mais aussi à l'échelle de chaque cellule, une régulation fine de ses concentrations et de sa distribution.

Ma thèse avait pour but de mieux comprendre les mécanismes de régulation du transport intracellulaire du cholestérol. En effet, c'est le transport du cholestérol qui conditionne sa distribution et le contrôle de son homéostasie. La régulation de l'homéostasie du cholestérol est un élément particulièrement critique pour les macrophages spumeux de la paroi des artères, cellules caractéristiques de l'athérosclérose.

Nous avons concentré nos recherches sur le transport du cholestérol au niveau du compartiment endolysosomal. En effet, ce compartiment joue un rôle-clé dans la distribution intracellulaire du cholestérol et dans le contrôle de son homéostasie, mais peu d'acteurs moléculaires ont été identifiés.

Voici les objectifs qui ont été fixés au cours de la thèse :

- étudier le rôle du trafic endolysosomal dans l'homéostasie intracellulaire du cholestérol,
- caractériser l'effet du dynasore, une molécule chimique inhibant l'activité de la GTPase dynamine,
- étudier le rôle de Rab7 et de Rab9 dans le transport du cholestérol,
- et évaluer leur rôle dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et de son efflux.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Dynasore

Nous avons vu dans l'introduction bibliographique, que la dynamine est un élément essentiel pour la formation des vésicules d'endocytose dans les voies dépendantes et indépendantes de la clathrine.

Une première étude réalisée par notre équipe dans des cellules HeLa a cependant montré que l'inhibition de la dynamine par l'expression d'une forme mutée de la protéine n'était pas suffisante pour bloquer l'endocytose des LDL (Robinet et al., 2006). En étudiant l'impact de ce mutant sur la répartition du cholestérol, nous avons montré que celui-ci était bloqué dans des endosomes anormalement élargis. De plus, la perturbation du transport du cholestérol entraînait une dérégulation de l'expression des gènes stérols-dépendants. Cette étude décrit donc le rôle nouveau de la dynamine depuis le compartiment endolysosomal vers le RE pour la régulation transcriptionnelle par la SREBP-2. Ces résultats démontrent l'action de la dynamine au niveau des endosomes comme proposé par S.M. Fergusson (Ferguson and De Camilli, 2012).

Nous avons voulu étendre l'étude du rôle de la dynamine à d'autres types cellulaires. Pour cela nous avons choisi d'utiliser le dynasore, un inhibiteur pharmacologique de la dynamine, dont les avantages sont d'avoir une action rapide et réversible, et de pouvoir être utilisé sur différents types cellulaires (Macia et al., 2006).

Pour conserver une certaine continuité avec l'étude précédente, nous avons choisi comme modèle cellulaire les cellules HeLa. Ces cellules sont un bon modèle pour l'étude du transport intracellulaire. Nous avons aussi utilisé des macrophages humains dérivés des monocytes (HMDM), cellules d'intérêt dans l'étude des mécanismes de formation de la plaque d'athérosclérose. Les monocytes ont été différenciés en macrophages par stimulation avec du M-CSF (macrophage colony stimulating factor). Ce facteur de différenciation permet d'obtenir des macrophages plus proches des macrophages retrouvés dans la plaque d'athérosclérose. Il faut aussi noter que les macrophages ont été surchargés avec des LDL acétylées (LDLac) contrairement aux cellules HeLa qui l'ont été avec des LDL natives. L'utilisation des ces LDLac est nécessaire pour surcharger efficacement les macrophages en cholestérol. En effet, les LDLac sont endocytées par la voie des récepteurs scavengers qui

ne sont pas régulés par le contenu cellulaire en cholestérol. De plus, ces LDLac vont se comporter comme les LDL modifiées présentes dans l'espace sous-endothélial et donc mieux mimer les phénomènes physiopathologiques.

Nous avons dans un premier temps optimisé les conditions d'utilisation du dynasore, puis nous avons réalisé une étude de l'impact du traitement avec le dynasore à deux niveaux :

- sur le transport et la distribution du cholestérol par des techniques d'immunofluorescence et de cytométrie,
- ainsi que sur la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau du RE par la mesure de l'expression des gènes stérols-dépendants et de l'activité de l'ACAT1.

Nous avons ensuite analysé les résultats en les comparants avec l'U18666A, molécule amphiphile cationique connue pour inhiber la sortie du cholestérol du compartiment endolysosomal et couramment utilisée pour étudier cette étape du transport cellulaire (Cenedella, 2009).

Ce travail a fait l'objet d'une communication par affichage lors du congrès de l'EAS (European Atherosclerosis Society) qui a eu lieu à Göteborg (Suède) du 26 au 29 juin 2011 et d'un article publié en décembre 2011 dans le journal PLoS ONE.

I. 1. Article 1

The dynamin chemical inhibitor dynasore impairs cholesterol trafficking and sterol-sensitive genes transcription in human HeLa cells and macrophages.

Girard E, Paul JL, Fournier N, Beaune P, Johannes L, Lamaze C, Védie B.

PLoS One. 2011;6(12):e29042.

The Dynamin Chemical Inhibitor Dynasore Impairs Cholesterol Trafficking and Sterol-Sensitive Genes Transcription in Human HeLa Cells and Macrophages

Emmanuelle Girard^{1,2}, Jean Louis Paul^{1,2}, Natalie Fournier^{1,2}, Philippe Beaune¹, Ludger Johannes^{3,4}, Christophe Lamaze^{3,4,*}, Benoît Védie^{1,5}

1 AP-HP (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris), Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Biochimie, Paris, France, **2** Université Paris-Sud, EA 4529, UFR de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France, **3** CNRS UMR144, Paris, France, **4** Institut Curie, Centre de Recherche, Laboratoire Trafic, Signalisation et Ciblage Intracellulaires, Paris, France

Abstract

Intracellular transport of cholesterol contributes to the regulation of cellular cholesterol homeostasis by mechanisms that are yet poorly defined. In this study, we characterized the impact of dynasore, a recently described drug that specifically inhibits the enzymatic activity of dynamin, a GTPase regulating receptor endocytosis and cholesterol trafficking. Dynasore strongly inhibited the uptake of low-density lipoprotein (LDL) in HeLa cells, and to a lower extent in human macrophages. In both cell types, dynasore treatment led to the abnormal accumulation of LDL and free cholesterol (FC) within the endolysosomal network. The measure of cholesterol esters (CE) further showed that the delivery of regulatory cholesterol to the endoplasmic reticulum (ER) was deficient. This resulted in the inhibition of the transcriptional control of the three major sterol-sensitive genes, sterol-regulatory element binding protein 2 (SREBP-2), 3-hydroxy-3-methyl-coenzymeA reductase (HMGCoAR), and low-density lipoprotein receptor (LDLR). The sequestration of cholesterol in the endolysosomal compartment impaired both the active and passive cholesterol efflux in HMDM. Our data further illustrate the importance of membrane trafficking in cholesterol homeostasis and validate dynasore as a new pharmacological tool to study the intracellular transport of cholesterol.

Citation: Girard E, Paul JL, Fournier N, Beaune P, Johannes L, et al. (2011) The Dynamin Chemical Inhibitor Dynasore Impairs Cholesterol Trafficking and Sterol-Sensitive Genes Transcription in Human HeLa Cells and Macrophages. PLoS ONE 6(12): e29042. doi:10.1371/journal.pone.0029042

Editor: Wanjin Hong, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore

Received: July 20, 2011; **Accepted:** November 19, 2011; **Published:** December 19, 2011

Copyright: © 2011 Girard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by a grant from Agence Nationale de la Recherche (ANR- 08-GENO-002-01). E.G. is supported by a doctoral fellowship from Ministère de la Recherche. C.L. is the recipient of a Contrat Hospitalier de Recherche Translationnelle (CHRT) with Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: christophe.lamaze@curie.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Membrane trafficking contributes to cell cholesterol homeostasis through the control of intracellular cholesterol levels and compartmentalization. Little is known about the transport pathways involved in cholesterol trafficking and the associated molecular machinery [1]. The level of cellular cholesterol results from the tight control of both cholesterol neosynthesis and low-density lipoprotein (LDL)-derived cholesterol uptake. The uptake of LDL-derived cholesterol at the plasma membrane occurs primarily through clathrin-dependent endocytosis of the low-density lipoprotein receptor (LDLR), as shown in the seminal studies by Brown and Goldstein [2]. This process delivers lipoprotein-associated cholesterol esters (CE) first to the early endosome (EE) and then to the late endosomal/lysosomal network. At this stage, the acid hydrolases de-esterify CE into free cholesterol (FC), which will leave the endolysosomal network to reach the endoplasmic reticulum (ER) either directly or indirectly after transiting through the Golgi apparatus and the plasma membrane [3]. ER membranes, which are characterized by a poor content in cholesterol, are home to the principal

effectors of cellular cholesterol homeostasis. Key of this regulation is a family of membrane-bound transcription factors, sterol regulatory element binding proteins (SREBPs). Under low sterol concentration, SREBP is transported to the Golgi complex where it is activated by proteolytic processing. This cleavage releases the active form of SREBP, which is translocated to the nucleus where it regulates the transcription of sterol responsive genes involved in cholesterol synthesis (3-hydroxy-3-methyl-coenzymeA reductase (HMGCoAR)) or uptake (LDLR) [4]. Cholesterol transport to the ER is therefore a key element of the cholesterol homeostasis machinery. The levels of cholesterol are constantly monitored by the two chaperone proteins SCAP (SREBP cleavage activating protein) and INSIG (insulin-induced gene protein). SCAP is a SREBP Golgi escort protein while INSIG is an ER anchored protein. Binding of cholesterol or oxysterols to SCAP or to INSIG, respectively, promotes the interaction between SCAP and INSIG. The formation of this complex masks the binding site on SCAP that is recognized by the vesicular coat transport complex COPII, thereby blocking SREBP transport from the ER to the Golgi apparatus and the release of the cleaved SREBP active form [5,6]. Another important actor of this tight regulation is the acyl

CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) enzyme localized in the ER [7]. ACAT rapidly esterifies FC in CE to be stored in cytoplasmic lipid droplets, in response to an increased concentration of cholesterol in the ER. ACAT activity is therefore required for decreasing the amount of cytotoxic FC and for maintaining a low level of cholesterol in the ER membranes, such that minimal variations of sterol concentrations can be sensed. In some cases, ER-derived vesicular structures that are positive for ACAT can also be involved in this process. It has been proposed that these structures, which are distinct from the conventional ER, may protect the non-fragmented ER from being overloaded with cholesterol [8].

The GTPase dynamin is a mechano-chemical enzyme required for the pinching and release of a completed clathrin-coated pit from the plasma membrane. In HeLa cells expressing the K44A inactivated form of dynamin, we have revealed a new role for dynamin in the delivery of endolysosomal FC to the ER [9]. The inactivation of dynamin led to a Niemann-Pick type C-like phenotype (NPC) with the accumulation of swollen late endosomes/lysosomes (LE/LS) engorged with FC. Dynamin inactivation was also associated with a strong reduction of sterol-sensitive genes regulation and a decrease of the esterification of the intracellular pool of cholesterol by ACAT. If K44A HeLa cells are an easily amenable cell model, we sought to study the role of dynamin in more physiologically relevant cell types such as macrophages, which play a key role in atherosclerosis. However there are technical limitations to obtain macrophages expressing the inactivated form of dynamin. We therefore took advantage of the membrane permeant chemical compound, dynosore, a recently described noncompetitive inhibitor of the GTPase activity of dynamin [10,11]. Dynosore presents also the advantage to act within minutes and to have a completely reversible activity. To validate the use of this new drug, we studied the impact of dynosore on critical steps of cholesterol trafficking in both HeLa cells and HMDM. We show here that dynosore rapidly inhibits the egress of free cholesterol from the endolysosomal network in these two cell types. As a result, the sterol-sensitive gene regulation of cholesterol homeostasis is inhibited. Dynosore is therefore a new drug that will be useful for further understanding cholesterol endosomal trafficking, a key step in cholesterol homeostasis.

Materials and Methods

Cells and reagents

HeLa cells were cultured in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 2 mM glutamine, 100 UI/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Cells were treated with dynosore (Sigma-Aldrich) at 80 µM in the presence of 1% lipoprotein-deficient serum (LPDS) medium to avoid inactivation of dynosore by serum proteins. U18666A (Sigma-Aldrich) was used at 3 µg/ml in 1% LPDS medium.

Monocytes were isolated from human blood of normolipidemic donors by ficoll density gradient (Eurobio, les Ulis, France) and subsequently differentiated into human monocytes-derived macrophages (HMDM) by adhesion on plastic Primaria plates (Falcon BD, Franklin Lakes, NJ,) for 7 days in RPM1640 medium, supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM glutamine, 100 UI/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 20 ng/ml hM-CSF (human macrophages colony-stimulating factor) (AbCys, Paris, France).

HeLa cells expressing a GFP tagged M6PR were described in [12]. Cells were cultured in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS)

(Invitrogen), 2 mM glutamine, 100 UI/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich,) completed with geneticin. They were treated with dynosore the same way that HeLa cells.

Antibodies

The mouse anti-human Lamp-1 antibody was from BD Transduction Laboratories. Primary antibodies were revealed by incubation with Alexa Fluor®488 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen).

Cholesterol delivery to the cell

Human LDL ($d = 1.019\text{--}1.063\text{ g/ml}$) were separated from fresh plasma by sequential ultracentrifugation as described previously [9]. HeLa cells deprived of sterols for 48 h in 10% LPDS medium were incubated for the indicated times with LDL (200 µg/ml), supplemented with 50 µM pravastatin and 50 µM sodium mevalonate. HMDM were incubated with 50 or 100 µg/ml of acetylated LDL (AcLDL) prepared using the standard acetic anhydride-sodium acetate solution on ice as described [13].

LDL and AcLDL labeling

LDL were labeled with DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethyl-indocarbocyanine) as described previously [14]. Briefly, DiI were added to LDL to a final ratio of 300 µg for 1 mg LDL protein. After incubation for 18 h at 37°C under nitrogen and light protection, DiI-labeled LDL were isolated by ultracentrifugation and extensively dialyzed at 4°C against PBS (Eurobio). For DiI-AcLDL production, AcLDL were first labeled with DiI and acetylated.

LDL uptake assay

LDL uptake was described in [9]. Briefly, cells grown in LPDS medium during 48 h were washed in PBS and incubated at 37°C with increasing concentrations of DiI-LDL (HeLa cells) or DiI-AcLDL (HMDM) as indicated. After 4 h, cells were treated by trypsin to remove cell surface bound fluorescent LDL. Cells were detached and washed twice in PBS at 4°C. The fluorescence of internalized DiI-LDL or DiI-AcLDL was measured by flow cytometry (emission at 585 nm) and expressed as mean fluorescence intensity.

Measurement of cellular cholesterol

After 48 h of culture in LPDS medium, cells were incubated for 6 h with 200 µg/ml LDL (HeLa cells) or 50 µg/ml AcLDL (HMDM) and then lysed in 0.2 M NaOH. Total cholesterol was extracted with methanol (2.5 ml) followed by hexane (5 ml). About 4.5 ml of the hexane phase was evaporated under vacuum and dissolved in mobile phase. Separation of FC and CE including cholesteryl docohexanoate (CDH), cholesteryl arachidonate (CA), cholesteryl linoleate (CL), cholesteryl myristate (CM), cholesteryl oleate (CO) and cholesteryl stearate (CS) was done by reverse phase HPLC on a C-18 column (25×0.46 cm length, 5-µm pore size, Sigma-Aldrich) by measuring the 205 nm absorbance after elution with acetonitrile/isopropanol (30/70, v/v) [15,16]. The amount of proteins present in cell lysates and LDL preparations was measured using the bicinchoninic acid (BCA) method [17].

ACAT activity

120 µM sodium myristate (Sigma-Aldrich) was added during cholesterol delivery to the cells. The ACAT enzyme activity was evaluated by quantifying the incorporation of myristate into cholesteryl myristate by HPLC as described above. The ACAT inhibitor Sandoz 58-035 (Sigma-Aldrich) (10 µg/ml) was added to

the cholesterol loading medium. When ACAT activity is inhibited, CE are provided by pre-existing pools such as endocytosed LDL. Therefore, the difference in cholesterol esterification measured by HPLC with and without Sandoz 58-035 represents the specific amount of cholesterol esterified by ACAT.

Cellular cholesterol mass efflux to apoA-I and HDL in cholesterol-loaded macrophages

After treatment with dynasore or U18666A, HMDM were equilibrated in RPMI1640 0.2% BSA for 16 h in the presence or not of 5 $\mu\text{g/ml}$ 22-hydroxy-cholesterol (22OH-C) and 10 μM 9-cis retinoic acid (9cRA) (Sigma-Aldrich). Cellular cholesterol efflux to either 1 mg/ml methyl- β -cyclodextrin (M β CD), 10 $\mu\text{g/ml}$ lipid-free apoA-I (Sigma-Aldrich) or 15 $\mu\text{g/ml}$ high-density lipoprotein-phospholipids (HDL-PL isolated from normolipidemic human plasma by preparative ultracentrifugation) was measured during a 4 h chase period. Drugs were maintained during the equilibration and efflux periods. At the end of the efflux, the medium was collected and the cells lysed in 0.2 M NaOH. Cell and media were extracted and analyzed for free and esterified cholesterol mass by HPLC as described above. HDL samples were separately analyzed to allow correction for HDL cholesterol present in relevant media samples. Mass cholesterol efflux is expressed as the percentage of

efflux (medium cholesterol over total cholesterol-medium and cells) [18].

Immunofluorescence

Analysis of LDL-derived cholesterol trafficking was performed by immunofluorescence as described [9]. Briefly, HeLa cells and HMDM were grown on cover slips for 48 h in LPDS medium. To monitor LDL trafficking, cells were incubated with fluorescent LDL for indicated times. Cells were incubated with 200 $\mu\text{g/ml}$ LDL or 50 $\mu\text{g/ml}$ AcLDL and then stained with filipin (50 $\mu\text{g/ml}$) to detect FC as described [19]. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. For immunolocalization studies, cells were incubated with primary and secondary antibodies diluted in PBS/BSA with saponin. Cover slips were mounted in MOWIOL, and cells were imaged with an epifluorescent Leica microscope.

RNA extraction, RT-PCR and real time quantitative PCR

Total RNA was extracted from HeLa cells using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). One microgram of total RNA was transcribed to cDNA using random hexamers (Amersham, Orsay, France) and SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen). Specific primers were described previously [9].

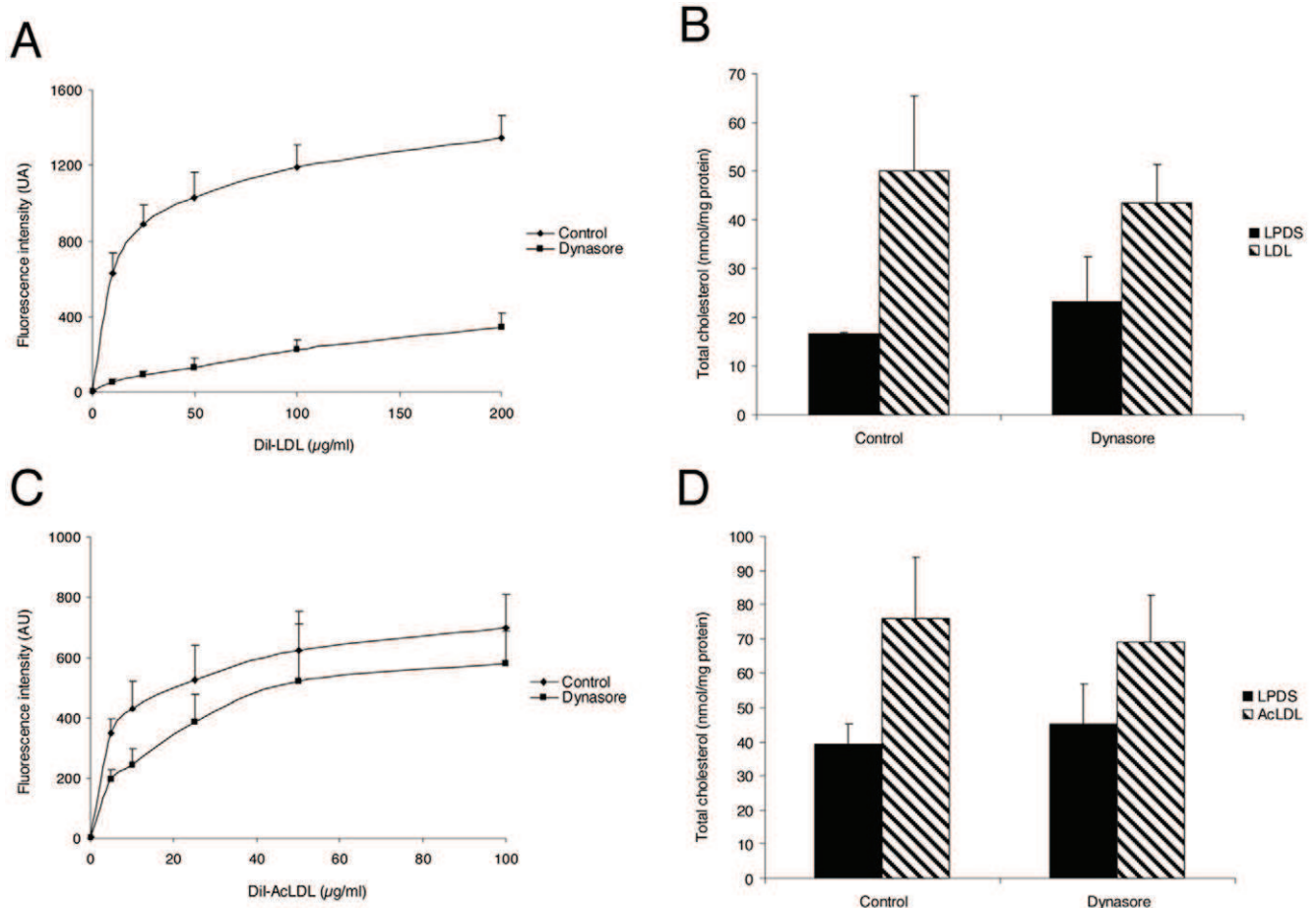


Figure 1. Effect of dynasore on LDL uptake and total cholesterol in HeLa cells and HMDM. Cells were incubated for 4 h with 0–200 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL (A) or 0–100 $\mu\text{g/ml}$ DiI-AcLDL (C) at 37°C with 0.4% v/v DMSO (control) or 80 μM dynasore. The total amount of endocytosed DiI-LDL or DiI-AcLDL was measured by flow cytometry. Values represent the mean \pm SD of triplicate experiments. Total cholesterol was quantified in HeLa cells (B) and HMDM (D) after 4 h of LDL uptake with 0.4% v/v DMSO (control) or 80 μM dynasore. Each value is the mean \pm SD of triplicate experiments and expressed as nanomoles per mg of cell proteins.

doi:10.1371/journal.pone.0029042.g001

Real-time quantitative PCR analyses were performed using the Sybr® Green reagents kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with an ABI PRISM 7900HT Sequence detector instrument (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Amplification was carried out in a final volume of 10 µL with 20 ng of reverse transcribed total RNA, 150 nM (HMGCoAR, LDLR) or 300 nM (UBC and SREBF-2) of both sense and antisense primers (Eurogentec, Liège, Belgium) in the Sybr® Green PCR Master Mix (MESA GREEN qPCR, Eurogentec). The cycling conditions comprised 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Relative quantification for a given gene, expressed as fold-variation over control at T0, was calculated after normalization to a reference gene (UBC) and determination of the CT (cycle threshold) difference between conditioned cells and control cells at T0 using the comparative CT method [20]. Efficiencies of the target and control amplification were very similar.

Dynamin 2 RNAi Treatment

Non targeting siRNA (si scramble) and siRNA against dynamin2 (si Dyn2) (GGA CAU GAU CCU GCA GUUdTdT) were described in [21]. Briefly, HeLa cells were transfected using RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Knockdown of Dyn2 was observed 48 h post-treatment. Cells transfected with scramble siRNA were used as a control.

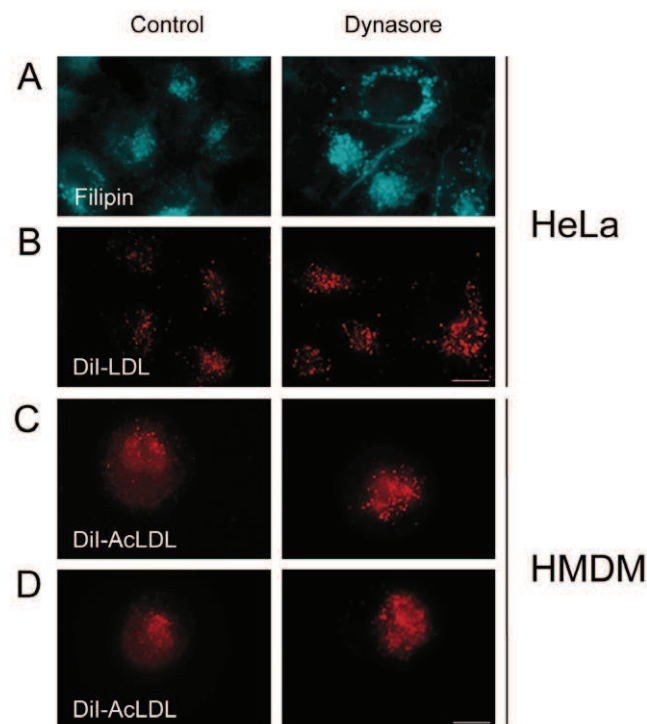


Figure 2. Effects of dynosore on the intracellular distribution of FC and LDL in HeLa cells and HMDM. (A) HeLa cells were loaded with 200 µg/ml LDL for 24 h. Cells were then treated for 6 h with 80 µM dynosore or without (control) and stained with filipin to detect FC. (B) Cells were treated as described above with 200 µg/ml Dil-LDL. (C) HMDM were incubated for 6 h in LPDS medium containing 50 µg/ml Dil-AcLDL with 80 µM dynosore or without (control). (D) HMDM were loaded with 50 µg/ml Dil-AcLDL for 24 h and then treated for 6 h with 80 µM dynosore or without (control). Images were obtained using wide-field epifluorescence microscopy. Scale bars, 10 µm. doi:10.1371/journal.pone.0029042.g002

Western Blotting

Cells were lysed in 1% triton ×100 in PBS containing protease inhibitors. Proteins (30 µg per lane) were separated on a 3–8% NuPAGE in Tris acetate gels (Invitrogen) and transferred to a PDVF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). The membrane was incubated for 1 h in blocking solution (5% nonfat dry milk, 0.1% Tween 20 in PBS). Dynamin 2 was detected using mouse monoclonal anti-dynamin 2 (Invitrogen). A rabbit anti-β-actin polyclonal antibody was used as loading control (Sigma). Development was performed with chemiluminescent detection kit (ECL, Amersham Life Science).

Results

Dynosore inhibits the uptake of LDL cholesterol in HeLa cells and human macrophages

We tested the effect of dynosore on HeLa cells, where dynamin was first reported to control CT trafficking [9]. Dynosore was tested at 80 µM, the concentration shown to efficiently block the internalization of the transferrin receptor [10]. We measured the uptake of fluorescently labeled human LDL by flow cytometry. Dynosore treatment led to a strong inhibition of LDL uptake at 10 µg/ml with less than 10% of the uptake level measured in untreated cells (Figure 1A). For comparison, the uptake of LDL was decreased by about 50% in our previous study with HeLa cells expressing the K44A inhibitory mutant of dynamin [9]. The continuous uptake of LDL for 6 hours in sterol-starved cells led to a 2.5 fold increase of the total amount of cellular cholesterol – free and esterified – as measured by HPLC in control cells. Despite the strong inhibition of LDL uptake, there was still an increase albeit more moderate in dynosore-treated cells (50 ± 15 and 43 ± 8 nmol/

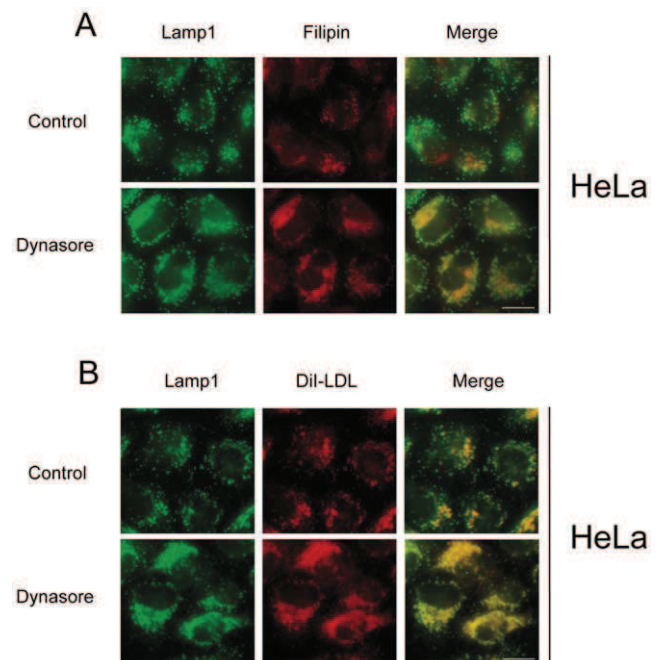


Figure 3. Dynosore treatment results in the endolysosomal accumulation of FC and LDL in HeLa cells. Cells were treated for 6 h with 80 µM dynosore or without (control) in medium containing 200 µg/ml LDL (A) or Dil-LDL (B) and processed for filipin staining (A) or Dil-LDL detection (B). Left panels present Lamp1 staining. Merge of Lamp1 with FC (A) or with Dil-LDL (B) is shown in the right panel. Scale bars, 10 µm. doi:10.1371/journal.pone.0029042.g003

mg cell protein, respectively; Figure 1B). This is in agreement with our findings in HeLa cells that cholesterol can enter cells through other dynamin-independent endocytic pathways [9]. We next characterized dynasore in HMDM since they play a central role in the formation and progress of atherosclerotic plaques [22]. The uptake of AcLDL in HMDM was twice as much less efficient than the uptake of LDL in HeLa cells (Figure 1C). The effect of dynasore was less important in HMDM since the uptake of AcLDL uptake was decreased by 50% at 10 $\mu\text{g/ml}$ and by 17% at 100 $\mu\text{g/ml}$. However, the absolute amount of endocytosed cholesterol was similar in HeLa cells and HMDM treated by dynasore. In agreement with the lower inhibition of AcLDL uptake, the measure of the total amount of cholesterol revealed no difference between control and dynasore-treated HMDM (Figure 1D).

Dynasore blocks the egress of free cholesterol from the late endosomal network in HeLa cells and human macrophages

We examined the intracellular distribution of FC derived from endocytosed LDL using filipin, a naturally fluorescent antibiotic that binds selectively to the FC fraction present in cellular membranes. We also visualized the intracellular distribution of DiI-LDL since we showed previously that DiI-LDL undergo the same endocytic and degradative processes than unlabeled LDL [9]. Cells were incubated with LDL for 24 hours to allow their distribution within the different endosomal compartments along the endocytic pathway. In control cells, FC was found into small endosomal structures within the cytoplasm of the cell (Figure 2A). A similar pattern was found for DiI-LDL (Figure 2B). Upon dynasore treatment, we could observe the accumulation of FC and Internalized DiI-LDL into numerous enlarged endosomes (Figures 2 A and B). We also examined the intracellular distribution of DiI-AcLDL in HMDM after 6 hours of internalization. Dynasore treatment led also to an increase of both the number and the size of the endosomal structures loaded with DiI-AcLDL (Figure 2C). This effect was enhanced when cells were first incubated with DiI-AcLDL for 24 hours before the addition of dynasore (Figure 2D). These endosomes were part of the late endosomal network since they were positive for the lysosomal associated membrane protein 1 (Lamp1), a marker of late endosomes and lysosomes (Figures 3 A and B). Thus, dynasore which blocks the GTPase activity of dynamin, causes the accumulation of endocytosed LDL-derived cholesterol in the late endocytic compartment and prevents its egress from this compartment in both HeLa and HMDM cells. This is in agreement with our previous study showing that dynamin controls the delivery of cholesterol from late endosomes to the ER in HeLa cells [9]. The abnormal endosomal accumulation of LDL was already observed after 15 min of dynasore treatment indicating that dynasore acts at the endolysosomal level in the same order of time that it requires to inhibit the uptake of transferrin and LDL at the plasma membrane (data not shown) [10].

Down-expression of dynamin results in the inhibition of free cholesterol egress from the late endosomal network

To confirm the specificity of dynasore treatment, we depleted endogenous dynamin 2, the major dynamin isoform expressed in HeLa cells using specific siRNA. Dyn2 siRNA treatment led to a strong down-expression of dynamin 2 as assessed by real time quantitative RT-PCR (data not shown) and western blot analysis (Figure 4A). Under this treatment, there was an accumulation of swollen endosomal structures loaded with LDL or FC, and positive

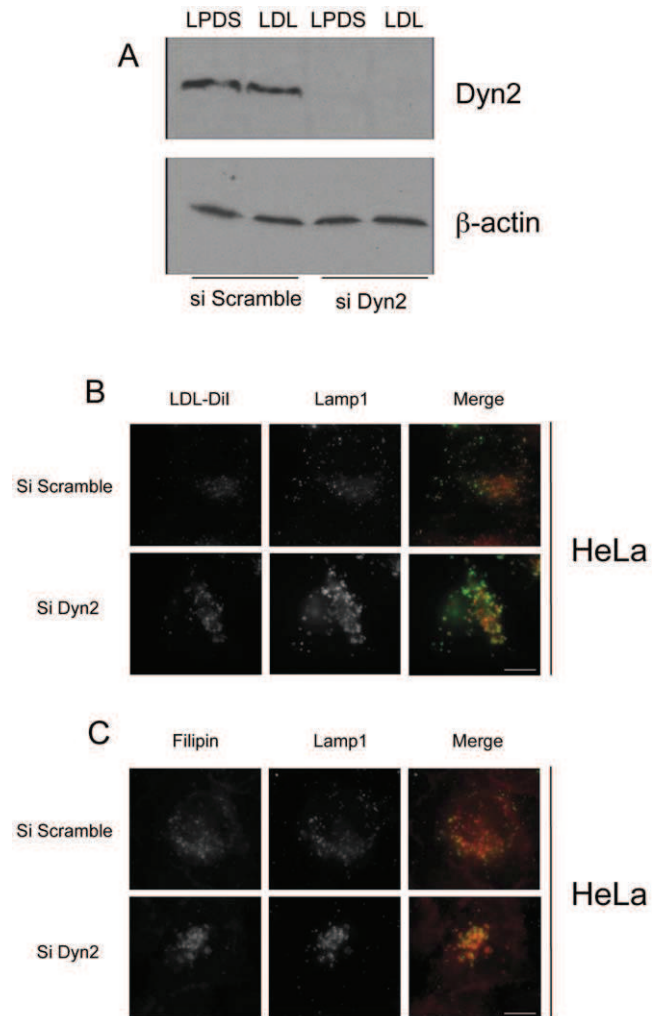


Figure 4. Dynamin silencing leads to endolysosomal accumulation of FC and LDL in HeLa cells. HeLa cells were transfected with Dyn2 siRNA or scramble siRNA (control) for 48 h in LPDS medium (LPDS) or LPDS medium and 200 $\mu\text{g/ml}$ LDL (LDL). Dyn2 and actin levels were determined by western blot (A). Cells were loaded for 6 h with 200 $\mu\text{g/ml}$ LDL and stained with filipin to detect FC (C). Cells were treated as described above with 200 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL (B). Images were obtained using wide-field epifluorescence microscopy. Scale bars, 10 μm .

doi:10.1371/journal.pone.0029042.g004

for Lamp1 (Figure 4 B and C). These results faithfully reproduce the phenotype observed with dynasore treatment and therefore exclude dynasore side effects at the endosomal interface.

Dynasore prevents the down-regulation of sterol-sensitive genes induced by exogenous LDL-derived cholesterol

The delivery of FC from the late endolysosomal compartment to the ER is a key process in the transcriptional regulation of sterol-sensitive genes [1,7,9]. We therefore studied whether dynasore had an impact on this regulation. In contrast to the conditional K44A HeLa cell line that requires 48 hours to express the K44A dynamin mutant [9], dynasore is active within a few minutes. We thus determined the minimal amount of time required to measure an effect of dynasore on the expression of the LDLR gene, one of the major actors of the transcriptional control

of cholesterol homeostasis [2]. After 48 hours of sterol starvation, cells were incubated with LDL in the presence or in the absence of dynasore. The kinetics of expression of the LDLR gene were monitored by real time quantitative RT-PCR analysis in HeLa cells (Figure 5A). As expected in cells that are in excess of exogenous cholesterol, a potent repression of the expression of the LDLR gene was measured as early as 5 hours after the addition of LDL and for as long as 24 hours in control cells. In contrast, no down-expression of the LDLR gene could be measured in cells treated with dynasore at similar times, and LDLR expression levels were similar to those observed in cells not supplemented with LDL. Seven hours after LDL addition, however, the effect of dynasore decreased progressively and the level of LDLR gene

expression resumed to control values at 24 hours. Thus, we chose to analyze the effects of dynasore after 6 hours of LDL addition, which corresponds to a strong repression of the sterol-sensitive transcriptional response in control cells and to the maximal inhibition by dynasore. At 6 hours, dynasore also strongly inhibited the LDL-induced repression of another major sterol-sensitive gene, HMGCoAR, whereas the repression on SREBF-2 gene expression was not observed at this time in HeLa cells (Figure 5B). Similar results were obtained in dynasore-treated HMDM, with a strong inhibition of the down-regulation of sterol-sensitive genes (LDLR, HMGCoAR and to a lesser extent, SREBF-2) induced by AcLDL (Figure 5C). These data are in agreement with the accumulation of LDL and AcLDL in enlarged

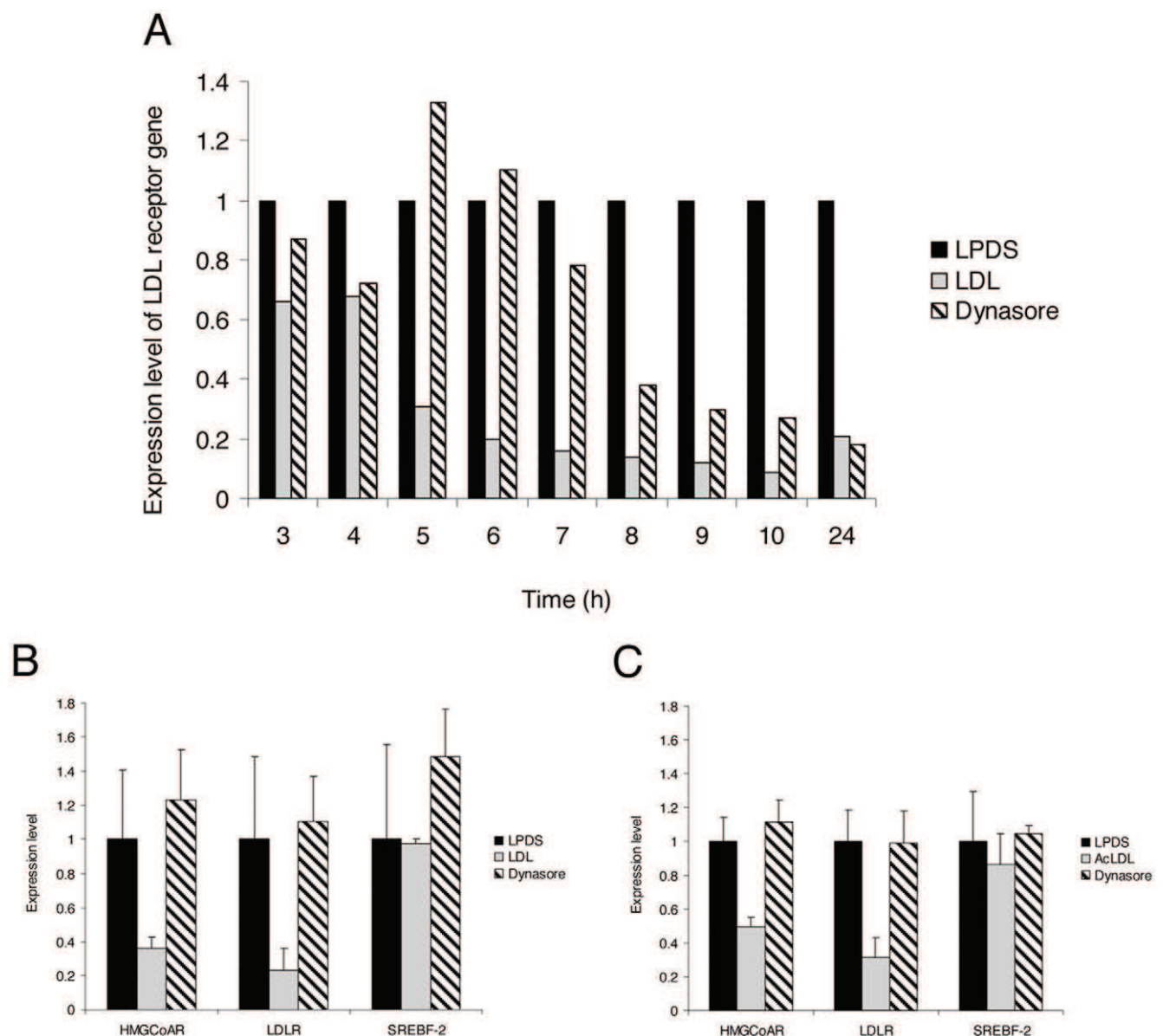


Figure 5. Dynasore blocks sterol-sensitive genes regulation in HeLa cells and HMDM. (A) Kinetics of LDLR expression analyzed by RT-PCR. HeLa cells were grown in LPDS medium for 48 h and further incubated for the indicated times with medium containing either LPDS, 200 µg/ml LDL, or 200 µg/ml LDL with 80 µM dynasore. (B) The expression level of sterol-sensitive genes (LDLR, HMGCoAR and SREBF-2) was quantified after 6 h in HeLa cells grown in LPDS, with 200 µg/ml LDL or 200 µg/ml LDL with 80 µM dynasore, as indicated. (C) The same experiment was performed in HMDM with 50 µg/ml AcLDL. Relative quantification of LDLR, HMGCoAR, and SREBF-2 genes in HeLa cells or HMDM was expressed as fold-variation over control (LPDS/DMSO) after normalization. All CT determinations were made in triplicate. doi:10.1371/journal.pone.0029042.g005

endosomes observed in both cell types (Figure 2) and are likely to reflect a defect in the delivery of LDL-derived cholesterol to the ER.

Dynasore prevents the esterification of exogenous LDL-derived cholesterol

We next measured the fraction of esterified cholesterol by the ACAT enzyme as a marker of the amount of FC being delivered to the ER. Indeed, CE are generated from FC by the activity of the ACAT enzyme [7]. Since this enzyme is strictly localized in the ER membranes, the amount of cholesterol esterified by ACAT reflects the amount of FC delivery to the ER [23,24]. Thus, we measured by HPLC the balance between the pools of free and esterified intracellular cholesterol. When HeLa cells were grown under sterol starvation, cholesterol was mainly detected as FC and esters represented less than 5% of total cholesterol (Figure 6A). After the addition of LDL, the total amount of CE represented more than 30% of total cholesterol. Dynasore treatment reduced this amount by about 15%. This moderate inhibition disagrees with the complete absence of sterol-sensitive genes repression in dynasore treated cells as observed above. Thus, we studied

whether a fraction of the measured pool of CE may be independent from the ER-ACAT activity. Indeed, dynasore treatment leads to the abnormal endosomal accumulation of LDL, which are unlikely to be de-esterified by the lysosomal hydrolases and thus could contribute to the total intracellular pool of CE. Therefore, we measured the total amount of CE in HeLa cells in which ACAT activity was pharmacologically inhibited. Under this condition, we found that the amount of CE generated by ACAT accounted for only 38% of the total intracellular pool of CE (Figure 6A). When cells were treated with dynasore, this amount decreased to about 10%, which represents a 74% inhibition of LDL-derived cholesterol esterification. We could confirm this result by measuring the synthesis of cholesteryl myristate by ACAT, an ester that was not initially present in our cells. After addition of myristate, we found by HPLC that the production of cholesteryl myristate was decreased by 80% in cells treated with dynasore (Figure 6B).

In HMDM, dynasore treatment decreased the total amount of CE more efficiently than in HeLa cells (Figure 6C). However, the level of CE was initially lower in HMDM than in HeLa cells (11% versus 35%, respectively). This could be due to different kinetics of

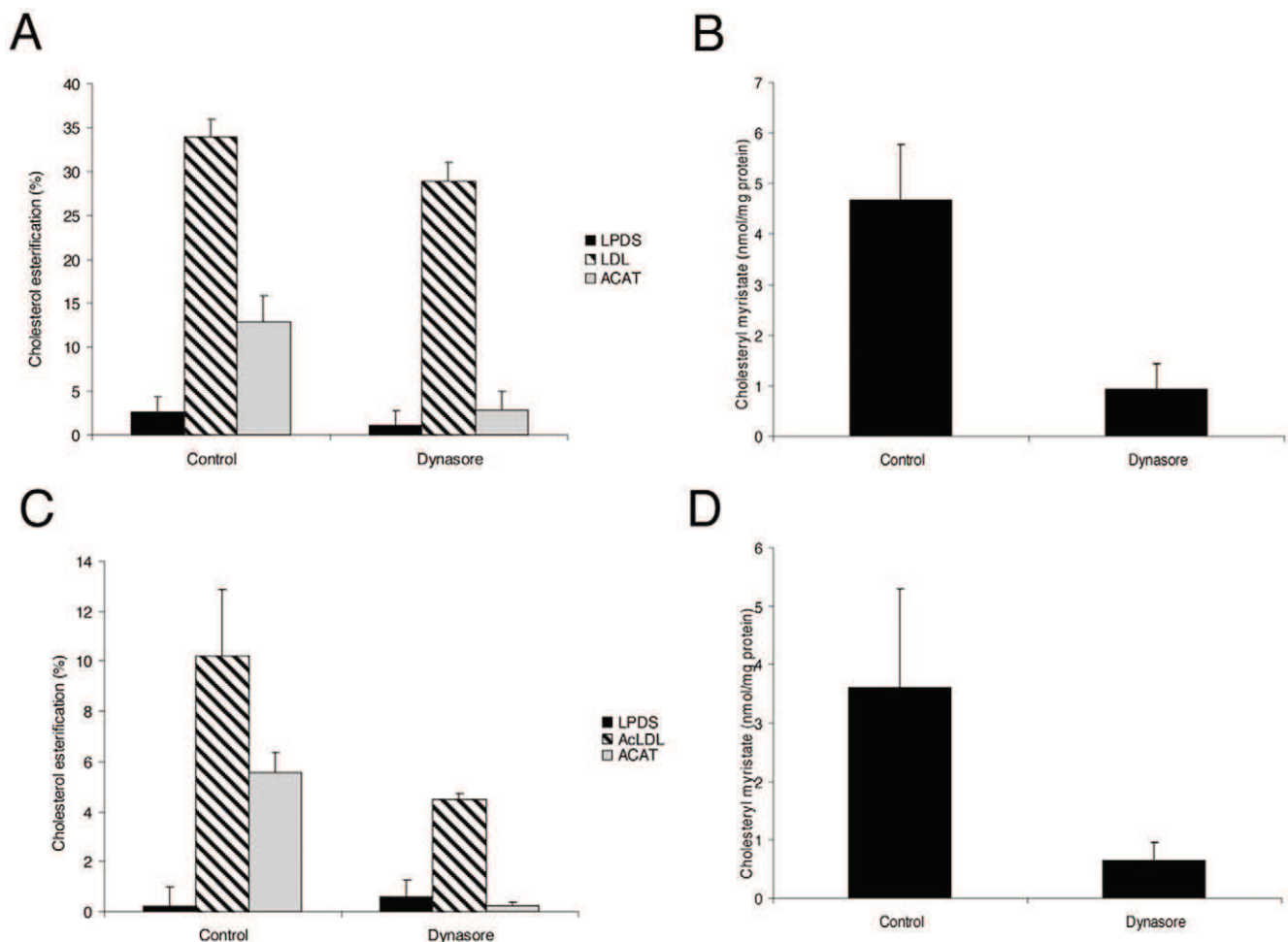


Figure 6. Dynasore decreases the production of cholesterol esters from LDL- or AcLDL-derived cholesterol. HeLa cells or HMDM were respectively incubated with 200 μ g/ml LDL (A) or 50 μ g/ml AcLDL (C) and treated for 6 h with 80 μ M dynasore or without (control). The total amount of CE was quantified and expressed as the percent of the total amount of cholesterol. ACAT-dependent ester formation was measured with 10 μ g/ml ACAT inhibitor (grey bars). The production of cholesteryl myristate was measured in HeLa cells (B) or HMDM (D) treated or not (control) with 80 μ M dynasore. Cholesteryl myristate was expressed in nmol/mg protein. Each value is the mean of triplicate experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0029042.g006

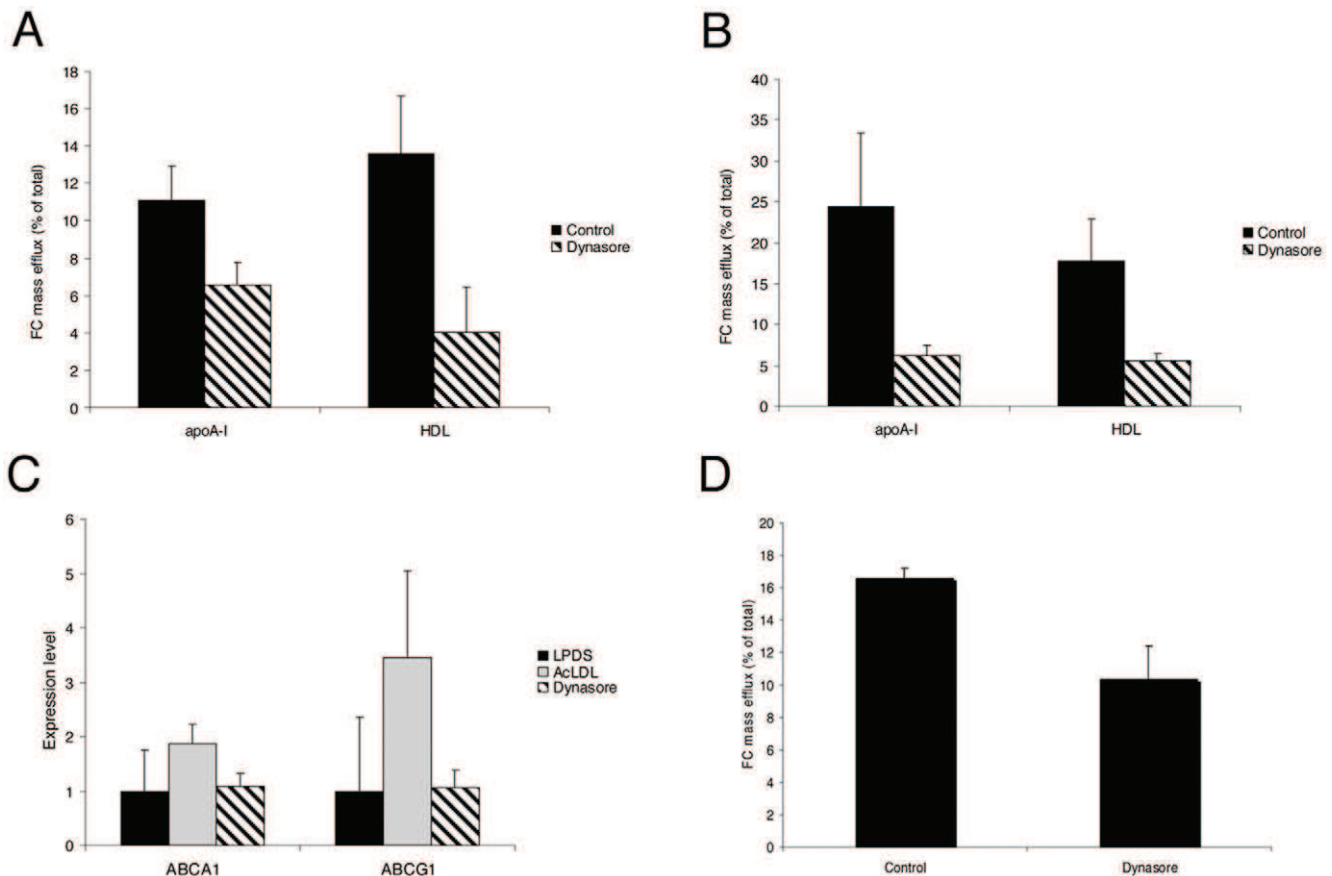


Figure 7. Dynosore impairs cellular cholesterol efflux from HMDM. HMDM were incubated for 6 h with 100 μ g/ml AcLDL with 80 μ M dynosore or without (control). The cellular cholesterol efflux to 10 μ g/ml apoA-I or 15 μ g/ml HDL-PL before (A) and after (B) stimulation of ABCA1 and ABCG1 expression by the LXR/RXR agonists was quantified. Results are expressed as the percentage of the quantity of released cellular cholesterol into the medium to the total quantity of cholesterol in cells and medium. Each value is the mean of triplicate experiments. (C) Relative quantification of ABCA1 and ABCG1 transporter genes levels was expressed as fold-variation over control (DMSO/LPDS) after normalization. All CT determinations were made in triplicate. (D) Passive cholesterol efflux to 1 mg/ml MâCD was quantified as above. doi:10.1371/journal.pone.0029042.g007

AcLDL uptake and the lower concentration used (50 μ g/ml). Indeed, after 24 hours of incubation with AcLDL, the level of CE in HMDM was higher and represented 40% of total cholesterol (data not shown). Again, dynosore treatment led to a strong decrease (90%) of the amount of CE specifically generated by ACAT (Figure 6C) and of the incorporation of myristate into CE (82% inhibition) (Figure 6D). Together these findings demonstrate that the abnormal endosomal accumulation of LDL induced by dynosore treatment results in a strong defect of FC delivery to the ER.

Dynosore decreased cholesterol efflux in human macrophages

Although reverse cholesterol transport (RCT) is a general peripheral process, macrophages are the primary cells that are overloaded with cholesterol in atherosclerotic lesions [25]. The efficiency of cholesterol efflux, the first step of RCT from macrophage foam cells, is determined not only by the activity of cholesterol transporters and extracellular acceptors, but also by the availability of cholesterol for efflux. It was therefore interesting to test whether the abnormal sequestration of large amounts of cholesterol in the endolysosomal compartment could affect the cholesterol efflux capacity of HMDM. Thus, we measured cholesterol mass efflux to either lipid-free apoA-I or to HDL

(high density lipoproteins) in HMDM loaded with AcLDL (Figure 7A). Dynosore treatment resulted in a strong decrease of cholesterol efflux to apoA-I (40%) and HDL (70%). Similar results were observed when cholesterol efflux was stimulated with the natural LXR/RXR agonists, 22OHC/9cRA (Figure 7B). The two ABC (ATP binding cassette) members of cholesterol transporters, ABCA1 and ABCG1 have been involved in cholesterol efflux to lipid poor apoA-I and HDL, respectively [25,26]. We thus examined the impact of dynosore treatment on ABCA1 and ABCG1 gene expression. As expected, the addition of AcLDL to HMDM led to an increase of ABCA1 and ABCG1 mRNA levels

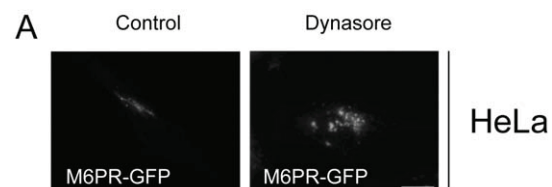


Figure 8. Dynosore treatment affects M6PR distribution. (A) Cells expressing GFP-M6PR were treated 6 h with 80 μ M dynosore or without (control). Images were obtained using wide-field epifluorescence microscopy. Scale bars, 10 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0029042.g008

(1.9-fold and 3.5-fold, respectively). However, this up-regulation was completely abolished when HMDM were treated by dynasore (Figure 7C). Finally, we examined whether dynasore treatment could affect the amount of cholesterol associated with the plasma membrane, which is involved in the passive cholesterol efflux pathway. To address this question, we used M β CD, a high-affinity acceptor of cholesterol. Short time incubation with M β CD was shown to remove cholesterol from the plasma membrane [27]. Under these conditions, cholesterol efflux was significantly decreased (34%) in dynasore-treated cells (Figure 7D). Together, these results indicate that dynasore, by affecting intracellular cholesterol trafficking, has a major impact on several pathways implied in active and passive cholesterol efflux.

Dynosore affects the intracellular distribution of the mannose 6-phosphate receptor

We tested whether dynasore could affect the trafficking of other cargos through the late endosomal network. We therefore studied the cation-independent mannose 6-phosphate receptor (M6PR), which constitutively recycles between late endosomes and the Golgi complex [28]. When HeLa cells expressing a GFP tagged M6PR were treated by dynasore, we observed that the M6PR was not present at the Golgi complex and was localized instead in dispersed endosomal structures (Figure 8). This result, in

agreement with a previous study [28], indicates that the effect of dynasore was not restricted to the block of FC from the late endosomal network but affected also cargo trafficking at this interface.

Comparison of dynasore and U18666A treatments on cholesterol trafficking in HeLa cells and macrophages

These results led us to compare the effects of dynasore with U18666A, a hydrophobic amine that has been extensively used to study cholesterol homeostasis, and more particularly cholesterol intracellular trafficking [29]. In contrast to dynasore, we found that U18666A treatment led to a respective 20% and 40% increase of LDL uptake and AcLDL in HeLa cells and HMDM (Figure 9 A and C). Accordingly, we measured an increase in the total amount of cholesterol present in HeLa cells and HMDM after U18666A treatment (Figures 9 B and D). The inhibition of cholesterol egress from late endosomes and lysosomes is a well-known effect of U18666A [29,30]. As expected, treatment with U18666A led to the formation of swollen endosomal structures loaded with FC in HeLa cells and HMDM (Figure 10). These structures were part of the endolysosomal network as confirmed by staining with Lamp1 (not shown). As a consequence, there was no response of sterol-sensitive genes to the addition of LDL or AcLDL in U18666A treated cells (Figures 11 A and B). In contrast to cells

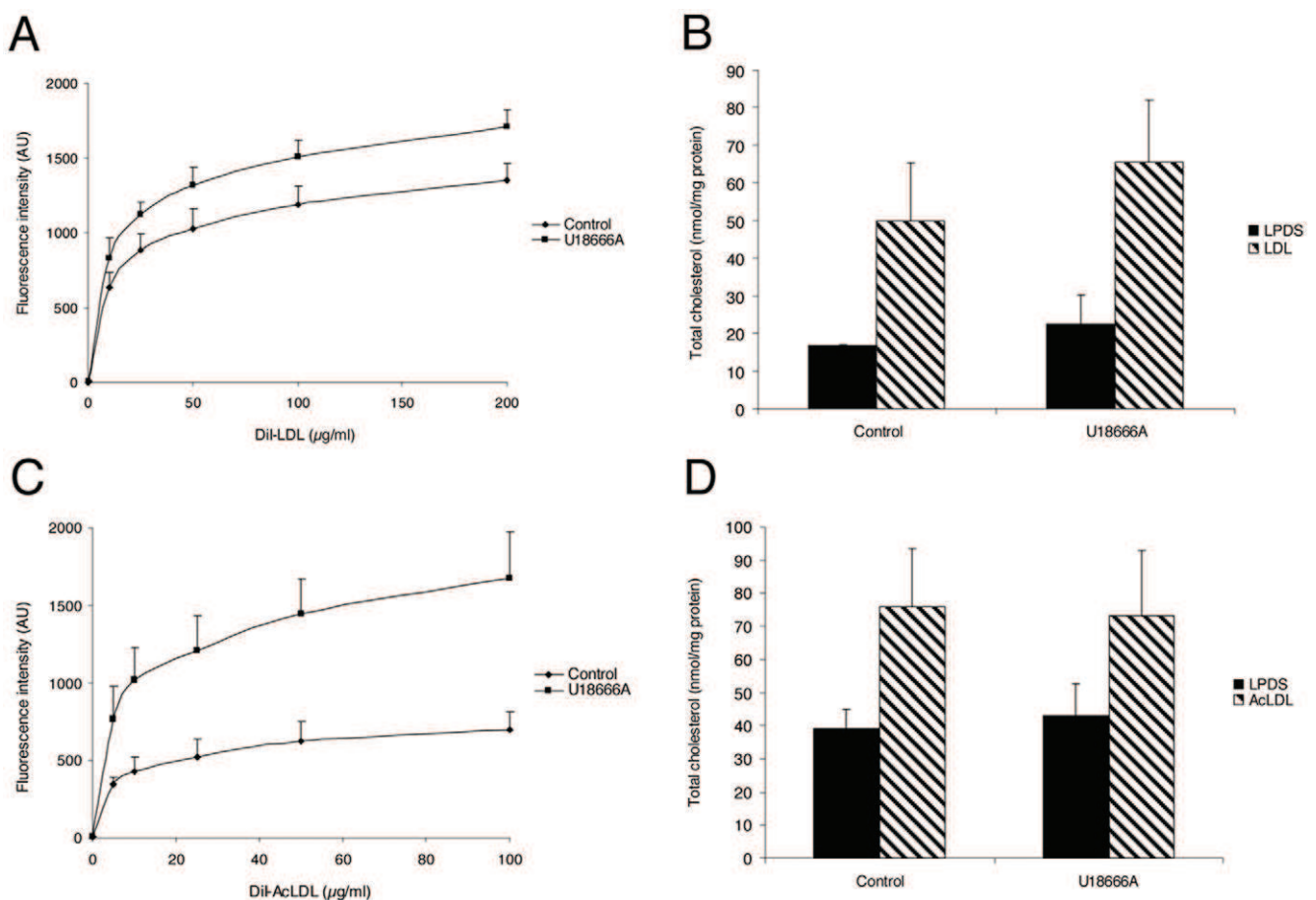


Figure 9. Effect of U18666A on LDL uptake and total cholesterol in HeLa cells and HMDM. LDL uptake was measured in HeLa cells (A) and HMDM (C) after incubation at 37°C for 4 h with 0–200 μ g/ml Dil-LDL or 0–100 μ g/ml Dil-AcLDL, respectively, with 3 μ g/ml U18666A or without (control). The amount of endocytosed Dil-LDL and Dil-AcLDL was measured by flow cytometry. Values represent the mean \pm SD of triplicate experiments. Total cholesterol was quantified in HeLa cells (B) and HMDM (D) after 4 h of LDL uptake with 3 μ g/ml U18666A or without (control). Each value is the mean \pm SD of triplicate experiments and expressed as nanomoles per mg of cell proteins. doi:10.1371/journal.pone.0029042.g009

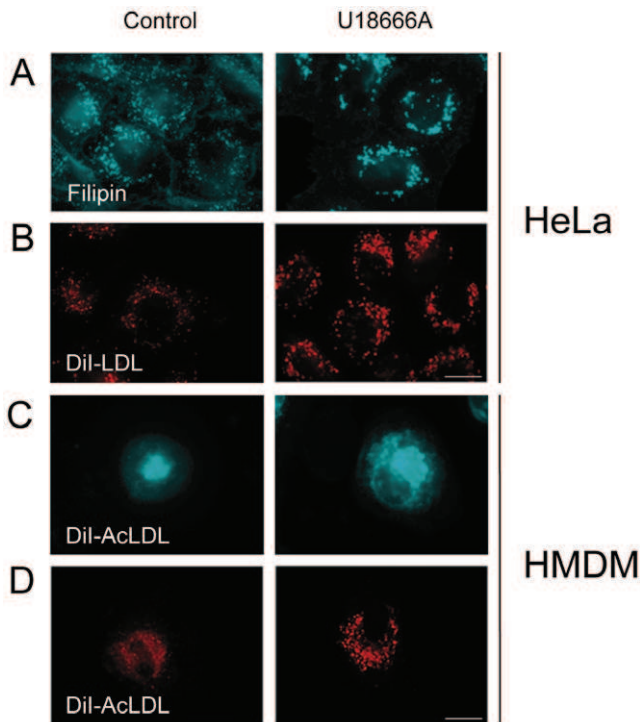


Figure 10. Effects of U18666A on the intracellular distribution of FC and LDL in HeLa cells and HMDM. HeLa cells and HMDM were respectively incubated for 6 h with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL (A) or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AcLDL (C) with 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ U18666A or without (control) and stained with filipin to detect FC. (B–D) HeLa cells and HMDM were respectively incubated for 6 h with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dil-LDL (B) or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dil-AcLDL (D) with 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ U18666A or without (control) and processed to visualize LDL distribution. Images were obtained using wide-field epifluorescence microscopy.
doi:10.1371/journal.pone.0029042.g010

treated with dynasore, we observed a slight increase in the percentage of CE in U18666A-treated cells (Figures 11 C and D). The measure of CE in cells loaded with cholesterol in the presence of the ACAT inhibitor revealed that the fraction of CE specifically generated by ACAT was 54% of the total intracellular pool of CE. When cells were treated with U18666A, the amount of CE generated by ACAT was decreased by 90%. Likewise the incorporation of myristate into CE was strongly inhibited by U18666A (Figure 11 E and F).

Finally, we also measured the effects of U18666A on cholesterol efflux. As shown in Figures 12 A and D, the cellular cholesterol efflux to apoA-I, HDL, and M β CD was decreased by 42%, 58%, and 37%, respectively when macrophages were treated with U18666A. A similar decrease was measured in AcLDL-loaded macrophages after stimulation by the LXR/RXR agonists, 22OHC/9cRA (Figure 12B). Like dynasore, U18666A completely blocked the increase of ABCA1 and ABCG1 mRNA levels in response to the addition of AcLDL in HMDM (Figure 12C).

Discussion

Dynosore is a small drug that was identified through a chemical screen designed for inhibitors of the dynamin GTPase activity [10]. Because of its cell membrane permeability and reversibility, dynasore has since been extensively used to block in a selective and powerful manner the different endocytic pathways that rely on the dynamin GTPase. In a previous work based on the expression of

the K44A inactivated mutated form of dynamin, we could demonstrate that dynamin activity was also required for proper sorting of cholesterol in the endolysosomal network of HeLa cells. K44A dynamin expression led to the inhibition of free cholesterol endosomal egress to the ER, which instead accumulated into swollen endosomes of the endolysosomal network. As a result, the sterol-sensitive gene regulation was inhibited [9].

In this study, we took advantage of the cell permeability of dynasore to further extend our understanding of cholesterol intracellular trafficking in human macrophages. We chose to work on HMDM isolated from peripheral blood since available mouse or human macrophages cell lines do not entirely reproduce the characteristics of primary cultured HMDM. The monocytes were differentiated into macrophages by hM-CSF instead of hGM-CSF since it favors the expression of cell surface markers that are closer to those found in macrophages from atherosclerotic lesions [31]. AcLDL were used instead of native LDL since AcLDL uptake is 20-fold higher in human macrophages [32]. Indeed, the class A macrophage scavenger receptor SR-A accounts for the majority of AcLDL uptake, a pathway that is unregulated and can lead to the intracellular accumulation of large amounts of cholesterol and foam cell formation. In contrast, the uptake of native LDL is minor and regulated in macrophages [33]. Moreover, Wang *et al.* have shown in macrophages that AcLDL-delivered cholesterol is preferentially transported into the late endosomal network whereas LDL-derived cholesterol is preferentially transported to the recycling compartment [34]. In this study, we show that dynasore recapitulates the effects of the K44A dynamin mutant on cholesterol homeostasis that we have first described in HeLa cells. Dynasore, however, was more efficient to block LDL uptake than the K44A mutant, which probably reflects the more homogeneous cell distribution of the drug. Interestingly, the inhibition of AcLDL uptake by dynasore was less efficient in human macrophages. This is in agreement with the lesser inhibition of AcLDL uptake that was also reported in HMDM after down-expression of clathrin [35]. Macrophages can use several alternative pathways such as macropinocytosis or caveolae for the uptake of AcLDL [35,36]. Our data suggest that the dynamin-independent endocytic pathways are the main contributors to AcLDL uptake in HMDM. In contrast to dynasore, U18666A leads to an increase of LDL uptake in both HeLa cells and HMDM. This increase, which is much higher in HMDM cells, can be inhibited by dynasore (not shown) indicating that U18666A up-regulates LDL uptake through the classical endocytic pathways. The increased LDL uptake is probably due to the known increased expression of LDL receptors resulting from the inhibition of FC delivery to the ER by U18666A. Dynasore treatment, which also leads to an increase of LDL receptor gene expression (Figure 4), does not result however in increased LDL uptake, because of its inhibitory effect on LDLR endocytosis through clathrin-coated pits.

We show that dynasore blocks the delivery of exogenous LDL-derived cholesterol from the endolysosomal network to the ER, resulting in the inhibition of both sterol-sensitive genes regulation and cholesterol esterification. Similar findings were found in cells where dynamin 2 was down-expressed by RNAi treatment confirming the specificity of dynasore effect at the late endosomal network. Interestingly, dynasore and U18666A present the same effects on cholesterol membrane trafficking and sterol-sensitive genes regulation.

The kinetics of the inhibition of LDL induced sterol-sensitive genes down-regulation showed that dynasore activity was maximal at 6 hours. We observed a progressive decrease of dynasore effect with time, an effect not observed with U18666A. Whether this is due to an inactivation of the drug with time or to the delivery of

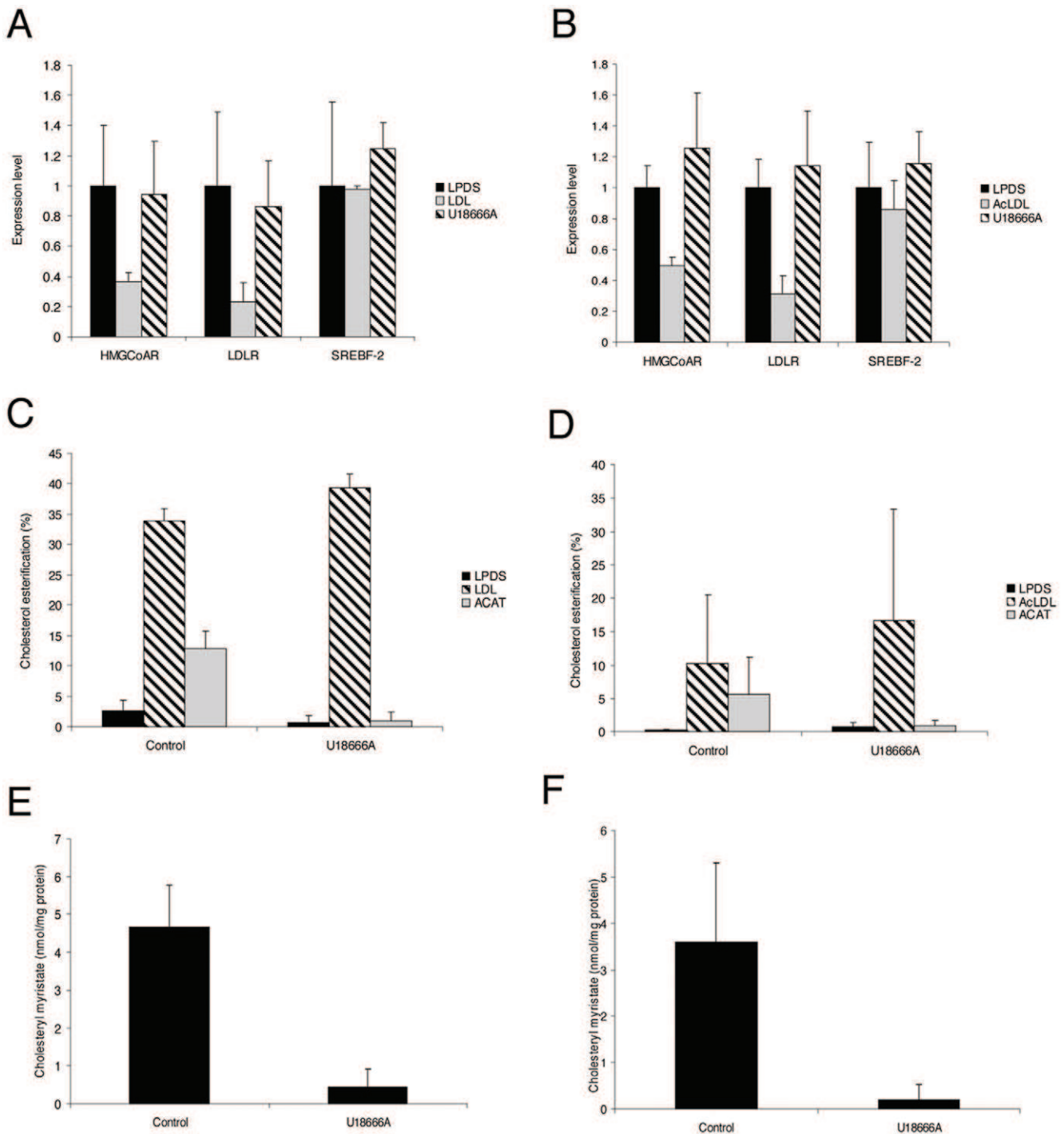


Figure 11. U18666A inhibits ACAT activity and sterol-sensitive genes regulation in HeLa cells and HMDM. Cells were grown in LPDS medium for 48 h and further incubated for 6 h with 200 μ g/ml LDL (A) or 50 μ g/ml AcLDL (B) with 3 μ g/ml U18666A or without (control). Relative quantification of LDLR, HMGCoAR, and SREBF-2 genes in HeLa cells (A) or HMDM (B) was expressed as fold-variation over control (LPDS/DMSO) after normalization. All CT determinations were made in triplicate. The total amount of CE was quantified in HeLa cells (C) and in HMDM (D) and expressed as the percent of the total amount of cholesterol. ACAT-dependent ester formation was measured with 10 μ g/ml ACAT inhibitor (grey bars). Cholesteryl myristate formation was measured in HeLa cells (E) or HMDM (F) with 3 μ g/ml U18666A or without (control). Cholesteryl myristate was expressed in nmol/mg protein. Each value is the mean of triplicate experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0029042.g011

FC to the ER by alternative pathways has to be documented. In this context, it is interesting that the inhibition of LDL uptake by dynasore persisted for 24 hours suggesting that the drug was still active at this time (data not shown).

Different cholesterol efflux pathways have been described that occur either by a non regulated diffusive process, or actively mediated by SR-BI and ABC transporters [26]. Recent studies indicate that ABCA1 and ABCG1 are the main contributors to the

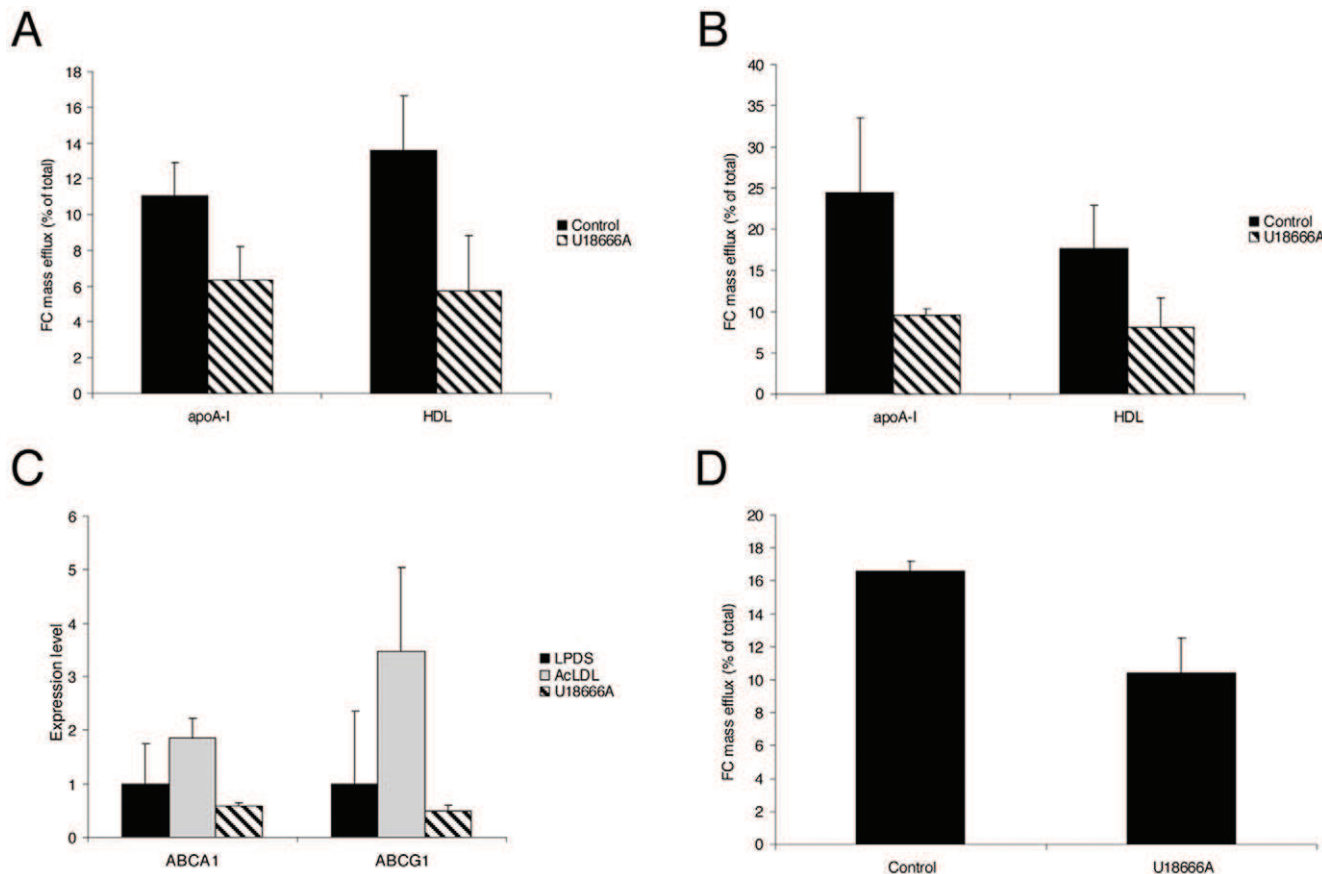


Figure 12. U18666A impairs cellular cholesterol efflux from HMDM. Cells were incubated with 100 μ g/ml AcLDL for 6 h and treated with 3 μ g/ml U18666A or without (control). The cellular cholesterol efflux to 10 μ g/ml apoA-I or 15 μ g/ml HDL-PL before (A) and after (B) stimulation of ABCA1 and ABCG1 expression by the LXR/RXR agonists was quantified. Results are expressed as the percentage of the quantity of released cellular cholesterol into the medium to the total quantity of cholesterol in cells and medium. Each value is the mean of triplicate experiments. (C) Relative quantification of ABCA1 and ABCG1 transporter genes levels expressed as fold-variation over control (DMSO/LPDS) after normalization. All CT determinations were made in triplicate. (D) Passive cholesterol efflux to 1 mg/ml M α CD was quantified as above. doi:10.1371/journal.pone.0029042.g012

net cholesterol efflux from macrophages to HDL or serum [34,37,38]. Our data show that the cholesterol efflux mediated by ABCA1 and ABCG1 was impaired in dynasore-treated HMDM, even after stimulation with the LXR/RXR agonist. Similar results were obtained with U18666A. It has been shown that the endolysosomal sequestration of LDL-derived cholesterol in NPC^{-/-} cells altered cholesterol efflux by reducing the amount of cholesterol substrate available for ABCA1 and by defective synthesis of LDL-cholesterol-derived side-chain oxysterols [39,40]. The decreased production of oxysterols, which are endogenous LXR ligands, results in reduced ABCA1 and ABCG1 expression and lower cholesterol efflux activity [41]. 27-hydroxycholesterol is the most abundant oxysterol present in macrophages. A key step in 27-hydroxycholesterol synthesis is the delivery of cholesterol to mitochondria where is present the sterol-27-hydroxylase CYP27. It is therefore tempting to speculate that the decrease of ABCA1 and ABCG1 gene expression is due to a decreased delivery of cholesterol to mitochondria. Alternatively, the decrease of cholesterol efflux mediated by ABCA1 and ABCG1 could be the consequence of a reduction of the pool of FC at the plasma membrane since it is a preferential site to collect FC coming from the endolysosomal compartment.

The role of dynamin in endolysosomal sorting remains poorly documented. We show here that dynasore treatment affects not

only cholesterol trafficking but also the intracellular distribution of the M6PR. A recent work has shown that dynamin 2 controlled the exit of the EGFR from late endosomes through its association with CIN85 [42]. Altogether these data demonstrate that dynamin controls trafficking events within the endolysosomal system presumably through the scission of vesicular buds originating from early and/or late endosomes and affects several cargos that use this pathway.

In conclusion, we have shown that the pharmacological inhibition of the dynamin GTPase activity by dynasore leads rapidly to the abnormal endosomal sequestration of FC and LDL, resulting in defective sterol-sensitive genes regulation and cholesterol efflux in HMDM. These results demonstrate that dynasore can be used to block the egress of FC from the endolysosomal network. Dynasore therefore represents an interesting alternative to U18666A and will be useful to better understand the complexity of cholesterol trafficking and homeostasis at the late endosomal interface.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EG JLP NF CL BV. Performed the experiments: EG BV. Analyzed the data: EG CL BV. Contributed reagents/materials/analysis tools: PB LJ CL BV. Wrote the paper: EG CL BV.

References

1. Ikonen E (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 125–138.
2. Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34–47.
3. Soccio RE, Breslow JL (2004) Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1150–1160.
4. McPherson R, Gauthier A (2004) Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. *Biochem Cell Biol* 82: 201–211.
5. Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6511–6518.
6. Sun LP, Seemann J, Goldstein JL, Brown MS (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6519–6526.
7. Chang TY, Chang CC, Cheng D (1997) Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu Rev Biochem* 66: 613–638.
8. Sakashita N, Chang CC, Lei X, Fujiwara Y, Takeya M, et al. (2010) Cholesterol loading in macrophages stimulates formation of ER-derived vesicles with elevated ACAT1 activity. *J Lipid Res* 51: 1263–1272.
9. Robinet P, Fradagrada A, Monier MN, Marchetti M, Cogny A, et al. (2006) Dynamin is involved in endolysosomal cholesterol delivery to the endoplasmic reticulum: role in cholesterol homeostasis. *Traffic* 7: 811–823.
10. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, et al. (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 10: 839–850.
11. Kirchhausen T, Macia E, Pelish HE (2008) Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods Enzymol* 438: 77–93.
12. Amessou M, Fradagrada A, Falguieres T, Lord JM, Smith DC, et al. (2007) Syntaxin 16 and syntaxin 5 are required for efficient retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. *J Cell Sci* 120: 1457–1468.
13. Kritharides L, Jessup W, Mander EL, Dean RT (1995) Apolipoprotein A-I-mediated efflux of sterols from oxidized LDL-loaded macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 276–289.
14. Stephan ZF, Yurachek EC (1993) Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res* 34: 325–330.
15. Kritharides L, Jessup W, Gifford J, Dean RT (1993) A method for defining the stages of low-density lipoprotein oxidation by the separation of cholesterol- and cholesteryl ester-oxidation products using HPLC. *Anal Biochem* 213: 79–89.
16. Attia N, Fournier N, Vedic B, Cambillau M, Beaune P, et al. (2010) Impact of android overweight or obesity and insulin resistance on basal and postprandial SR-BI and ABCA1-mediated serum cholesterol efflux capacities. *Atherosclerosis* 209: 422–429.
17. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76–85.
18. Larrede S, Quinn CM, Jessup W, Frisdal E, Olivier M, et al. (2009) Stimulation of Cholesterol Efflux by LXR Agonists in Cholesterol-Loaded Human Macrophages Is ABCA1-Dependent but ABCG1-Independent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1930–1936.
19. Eskelinen EL, Schmidt CK, Neu S, Willenborg M, Fuertes G, et al. (2004) Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell* 15: 3132–3145.
20. Applied Biosystems (2001) Relative quantification of gene expression. *User Bulletin* 2: 11–15.
21. Romer W, Berland L, Chambon V, Gaus K, Windschiegel B, et al. (2007) Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 450: 670–675.
22. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801–809.
23. Khelef N, Soe TT, Quehenberger O, Beatini N, Tabas I, et al. (2000) Enrichment of acyl coenzyme A:cholesterol O-acyltransferase near trans-golgi network and endocytic recycling compartment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1769–1776.
24. Du X, Pham YH, Brown AJ (2004) Effects of 25-hydroxycholesterol on cholesterol esterification and sterol regulatory element-binding protein processing are dissociable: implications for cholesterol movement to the regulatory pool in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 47010–47016.
25. Cuchel M, Rader DJ (2006) Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 113: 2548–2555.
26. Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N (2008) HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab* 7: 365–375.
27. Sugii S, Reid PC, Ohgami N, Du H, Chang TY (2003) Distinct endosomal compartments in early trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem* 278: 27180–27189.
28. Duncan JR, Kornfeld S (1988) Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors: return to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 106: 617–628.
29. Cenedella RJ (2009) Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids* 44: 477–487.
30. Liscum L, Munn NJ (1999) Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1438: 19–37.
31. Waldo SW, Li Y, Buono C, Zhao B, Billings EM, et al. (2008) Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 172: 1112–1126.
32. Bonet B, Chait A, Gown AM, Knopp RH (1995) Metabolism of modified LDL by cultured human placental cells. *Atherosclerosis* 112: 125–136.
33. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 333–337.
34. Wang MD, Kiss RS, Franklin V, McBride HM, Whitman SC, et al. (2007) Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways. *J Lipid Res* 48: 633–645.
35. Zhu XD, Zhuang Y, Ben JJ, Qian LL, Huang HP, et al. (2011) Caveolae-dependent Endocytosis Is Required for Class A Macrophage Scavenger Receptor-mediated Apoptosis in Macrophages. *J Biol Chem* 286: 8231–8239.
36. Jones NL, Reagan JW, Willingham MC (2000) The pathogenesis of foam cell formation: modified LDL stimulates uptake of co-incubated LDL via macropinocytosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 773–781.
37. Out R, Jessup W, Le Goff W, Hoekstra M, Gelissen IC, et al. (2008) Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1. *Circ Res* 102: 113–120.
38. Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, et al. (2007) The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res* 48: 2453–2462.
39. Choi HY, Karten B, Chan T, Vance JE, Greer WL, et al. (2003) Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoalphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem* 278: 32569–32577.
40. Frolov A, Zielinski SE, Crowley JR, Dudley-Rucker N, Schaffer JE, et al. (2003) NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. *J Biol Chem* 278: 25517–25525.
41. Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, et al. (2001) 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* 276: 38378–38387.
42. Schroeder B, Weller SG, Chen J, Billadeau D, McNiven MA (2010) A Dyn2-CIN85 complex mediates degradative traffic of the EGFR by regulation of late endosomal budding. *EMBO J* 29: 3039–3053.

I. 2. Résultats

Dans cette étude, nous avons utilisé le dynasore pour bloquer rapidement et spécifiquement l'action de la dynamine dans les cellules HeLa et les HMDM. L'utilisation de cet inhibiteur pharmacologique de la dynamine nous a semblé particulièrement adaptée à l'étude du rôle de la dynamine au niveau du compartiment endolysosomal. En effet, son action rapide (en quelques minutes seulement) nous a permis de bloquer au moment voulu le transport au niveau des endolysosomes en s'affranchissant de l'inhibition des étapes précoces de l'endocytose. Cette étude n'aurait pu être réalisée avec l'expression de mutants ou l'utilisation de siRNA qui nécessitent plusieurs jours de traitement et bloquent simultanément toutes les voies dépendantes de la dynamine.

Nous avons montré que le dynasore, comme attendu, inhibe l'entrée des LDL dans les deux types cellulaires. Cependant, cet effet est moins prononcé chez les HMDM que chez les cellules HeLa.

Nous avons ensuite étudié l'impact du dynasore sur le transport du cholestérol à partir des compartiments intracellulaires. Pour cela, les cellules ont été pré-incubées avec des LDL (natives pour les cellules HeLa et acétylées pour les HMDM) avant d'être traitées par le dynasore. Ce protocole nous a permis de mettre en évidence un blocage de la sortie des LDL du compartiment endolysosomal dans les deux types cellulaires. Dans les cellules HeLa, l'effet observé est bien spécifique de l'inactivation de la dynamine comme confirmé par ARN interférence.

Dans ces conditions de blocage du transport, nous avons quantifié l'arrivée des pools régulateurs de cholestérol au niveau du RE par le suivi de l'expression des gènes stérols-dépendants et l'évaluation de l'estérification du cholestérol. Le traitement par le dynasore provoque l'inhibition de la répression des gènes induite par les LDL dans les deux types cellulaires. Lorsque nous avons mesuré la quantité totale d'EC, nous avons observé une faible diminution de cette quantité, signe d'une moindre disponibilité du cholestérol pour être estérifié. Pour approfondir ces résultats, nous avons évalué par deux approches l'activité spécifique de l'ACAT1 et confirmé la diminution de l'estérification du cholestérol. Ces résultats témoignent de la diminution de l'arrivée du cholestérol au niveau du RE.

Enfin dans les macrophages, nous avons pu quantifier l'efflux actif du cholestérol *via* l'ABCA1 et l'ABCG1. En présence d'apo AI ou de HDL, nous avons montré que l'efflux est diminué. L'efflux passif mesuré par incubation avec de la méthyl-beta-cyclodextrine est lui aussi réduit. Ces résultats indiquent que le dynasore, en bloquant le transport intracellulaire du cholestérol, impacte plusieurs voies de l'efflux du cholestérol.

L'effet du dynasore sur le transport du cholestérol est très proche de l'effet obtenu par le traitement avec l'U18666A connu pour bloquer la sortie du cholestérol du compartiment endolysosomal. De plus, le rôle de la dynamine n'est pas limité au transport du cholestérol puisque le recyclage du MPR jusqu'au TGN est lui aussi perturbé par le traitement par le dynasore.

Pour conclure, ces résultats montrent que la dynamine contrôle la sortie de plusieurs cargos depuis le réseau endolysosomal, probablement en empêchant la formation des vésicules de transport depuis ce compartiment. Concernant le cholestérol, ces résultats montrent l'importance du transport vésiculaire du cholestérol dans la régulation de son homéostasie.

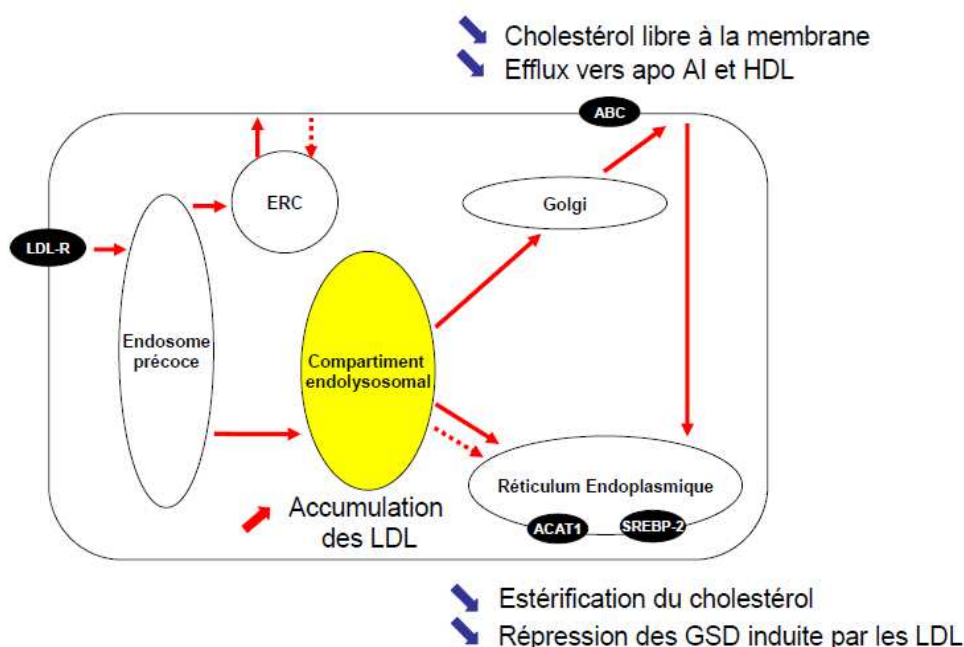


Figure 25 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'étude sur le rôle de la dynamine dans le transport endolysosomal du cholestérol

Lorsque les cellules HeLa et les HMDM sont traitées avec le dynasore, le cholestérol s'accumule dans le compartiment endolysosomal. Le cholestérol n'est alors plus délivré au RE et la régulation de l'homéostasie du cholestérol par SREBP-2 ainsi que son estérification par l'ACAT1 sont réduites. Dans les HMDM, la quantité de cholestérol présente à la membrane plasmique est diminuée ainsi que l'efflux actif par les transporteurs ABC vers l'apo AI et les HDL. Les flèches pleines représentent les transports vésiculaires et les flèches en pointillés les transports non vésiculaires. ABC, ATP binding cassette; ACAT1, acyl Coenzyme A:cholestérol acyl transférase 1, apo, apolipoprotéine; ERC, endosomal recycling compartment; GSD, gènes sterols-dépendants; HDL, high density lipoprotein; HMDM, human monocyte-derived macrophages; LDL, low density lipoprotein; LDL-R, LDL receptor; SREBP-2, sterol regulatory element binding protein 2.

I. 3. Discussion

Notre étude a permis de confirmer les résultats obtenus avec le mutant inactif de la dynamine dans les cellules HeLa et de les étendre aux macrophages humains.

Dans les deux types cellulaires, le traitement par le dynasore provoque l'accumulation des LDL et du cholestérol libre dans des endosomes élargis. Le blocage du transport du cholestérol entraîne une diminution de son arrivée au niveau du RE et dérégule le contrôle de son homéostasie. Des résultats similaires sont observés lorsque les cellules sont traitées avec l'U18666A.

Cependant, on peut noter certaines différences dans l'effet produit par le dynasore selon le type cellulaire. Le dynasore empêche presque complètement l'entrée des LDL dans les cellules HeLa (-90% d'endocytose) alors que l'effet est modéré dans les macrophages (-20%). Ces résultats sont en accord avec une étude antérieure qui a montré que dans les macrophages des voies d'endocytose indépendantes de la dynamine dont notamment la macropinocytose peuvent permettre l'entrée des LDLac (Jones and Willingham, 1999). Afin de mieux préciser dans quelle mesure la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et la macropinocytose participent à l'endocytose des LDLac dans les HMDM, il convient de bloquer ces voies par des inhibiteurs pharmacologiques et d'en analyser les effets sur l'entrée des LDLac. Les voies d'endocytose dépendantes de la clathrine seront inhibées par un inhibiteur pharmacologique récemment décrit le Pitstop (von Kleist et al., 2011). La macropinocytose sera bloquée par traitement des cellules avec l'amiloride (West et al., 1989).

Lorsque nous avons évalué l'impact du traitement sur l'arrivée du cholestérol au niveau du RE, nous avons dans un premier temps observé une disparité entre l'abolition totale de la régulation des gènes stérols-dépendants et la réduction modérée (seulement 15% dans les cellules HeLa) de la quantité d'EC. La mesure des EC n'étant pas discriminative entre les EC des LDL non hydrolysées et les EC produits par ré-estérification par l'ACAT1, nous avons développé deux techniques pour quantifier spécifiquement l'activité de l'ACAT1.

La première technique consiste à mesurer la formation des EC en présence d'un inhibiteur de l'ACAT, le Sandoz 58-035. En comparant avec la condition sans inhibiteur, on peut calculer la proportion d'EC dépendants réellement de la ré-estérification par l'ACAT1. Grâce à cette technique, nous avons quantifié une diminution drastique (-74% pour les cellules HeLa et -90% pour les HMDM) de l'estérification du cholestérol dans les deux modèles cellulaires. De plus, nous avons mis en évidence qu'une partie des EC n'est pas due à

l'action de l'ACAT1. Ces EC correspondent aux EC contenus dans les LDL non hydrolysées et accumulées dans le compartiment endolysosomal.

La deuxième technique est adaptée du dosage du cholestéryl oléate marqué formé par l'ACAT1 après incubation des cellules avec l'oléate marqué au tritium (Lapointe et al., 2006). Nous avons profité du fait que l'EC du myristate endogène n'est pas détectable à l'état basal dans nos échantillons. Nous avons donc quantifié l'activité spécifique de l'ACAT1 en mesurant la formation du cholestéryl myristate après incubation de nos cellules avec du myristate en excès. Dans ces conditions, le cholestérol présent à la membrane du RE est le facteur limitant de la réaction. La formation du cholestéryl myristate est donc proportionnelle à la quantité de cholestérol à la membrane du RE. Cette technique présente l'avantage d'être une technique froide et est une alternative à l'utilisation de l'oléate marqué au tritium. Nous observons une bonne corrélation des résultats obtenus avec ces deux techniques. Cela nous a permis de mettre en évidence la diminution d'estérification dans les cellules HeLa et les macrophages lors du traitement avec le dynasore mais plus encore avec l'U18666A où cette diminution est masquée par une accumulation massive d'EC indépendants de l'ACAT.

Le traitement des macrophages avec le dynasore et l'U18666A provoque une diminution de l'efflux actif (-40% pour l'efflux à l'apo AI et -70% pour l'efflux aux HDL) et de l'efflux passif (-34%) du cholestérol. Cette diminution peut être expliquée par une moindre disponibilité du cholestérol libre au niveau de la membrane plasmique comme mesurée par la méthyl-beta-cyclodextrine, mais aussi par le fait que les transporteurs ABCA1 et ABCG1 sont moins exprimés. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons quantifié l'expression des ARNm des deux transporteurs en présence et en absence des inhibiteurs. Par rapport aux conditions sans inhibiteurs, l'ABCA1 et l'ABCG1 sont moins exprimés (-40% pour l'ABCA1 et -60% pour l'ABCG1 en présence de dynasore, -60% et -80% en présence d'U18666A) lorsque les HMDM sont traités avec le dynasore ou l'U18666A. Ces résultats montrent que lorsque le transport du cholestérol est bloqué, la transcription des transporteurs ABCA1 et ABCG1 est diminuée.

Sachant que l'expression des deux transporteurs est contrôlée au niveau transcriptionnel par le complexe LXR/RXR, nous avons émis l'hypothèse que cette diminution d'expression est due à une moindre activation du complexe. Cette hypothèse s'appuie aussi sur des données indiquant que lorsque le cholestérol est bloqué dans les endosomes, la production des oxystérols, activateurs naturels du complexe LXR/RXR, est réduite (Frolov et al., 2003). Nous avons donc mesuré l'efflux actif vers l'apo AI et les HDL après stimulation avec des agonistes du complexe LXR/RXR. L'efflux mesuré dans ces conditions est identique à celui

mesuré sans stimulation du complexe. Ces résultats indiquent que c'est bien un défaut de cholestérol à effluer qui provoque la diminution de sa sortie et non un déficit en transporteurs.

Il a précédemment été montré par Nicoziani et coll. que le transport du MPR depuis les LE vers le TGN était bloqué par l'expression d'un mutant dominant négatif de la dynamine (Nicoziani et al., 2000). Nous avons donc étudié la distribution du MPR dans les cellules HeLa traitées par le dynasore. Nous avons montré que le dynasore permet également de bloquer le transport du MPR vers le TGN. Ces résultats valident l'utilisation du dynasore comme moyen d'étude de la sortie du compartiment endosomal et indiquent le blocage du transport n'est pas limité au cholestérol.

Suite à notre première description du rôle de la dynamine dans la sortie du cholestérol des endolysosomes, nous avons souhaité étudier spécifiquement le rôle de la dynamine au niveau du compartiment endolysosomal. Nous avons montré que la dynamine est impliquée dans les HeLa et les macrophages dans la sortie du cholestérol du compartiment endolysosomal. Cela pourrait être expliqué par la diminution de la scission des vésicules en formation depuis ce compartiment. Une étude concomitante à la notre s'est focalisée sur le rôle de la dynamine dans les étapes précoces du transport intracellulaire. Mesaki et coll. ont utilisé le dynasore pour bloquer le détachement des vésicules de recyclage depuis les EE (Mesaki et al., 2011). En bloquant la voie de recyclage, cette équipe a montré que la voie dégradative était aussi bloquée. Ces données, ainsi que les nôtres, démontrent l'importance de la dynamine à plusieurs niveaux du transport endosomal.

Notre article valide le dynasore comme outil pour l'étude du transport du cholestérol. L'utilisation du dynasore est d'autant plus intéressante pour des modèles cellulaires pour lesquels la transfection est difficile. Il propose également une alternative à l'utilisation de l'U18666A par son action rapide et réversible.

II. Rab7 et Rab9

Après avoir étudié la dynamine, nous nous sommes intéressés à d'autres acteurs du transport intracellulaire, les Rab GTPases. Comme décrit dans l'introduction bibliographique, les Rab forment une famille de protéines très importante car elles contrôlent toutes les étapes du transport vésiculaire. Parmi ces Rab, plusieurs ont montré la capacité de réduire les dépôts de cholestérol dans des fibroblastes de patients NPC lorsqu'elles étaient surexprimées : Rab4, Rab7, Rab8 et Rab9 (Choudhury et al., 2002; Linder et al., 2007). Sachant le rôle primordial du compartiment endolysosomal dans la distribution et le contrôle de l'homéostasie du cholestérol, nous avons centré nos recherches sur Rab7 et Rab9 car ces Rab agissent au niveau de ce compartiment.

Classiquement, Rab7 intervient dans le transport entre les LE et les lysosomes alors que Rab9 contrôle le transport entre les LE et l'appareil de Golgi. Si le rôle de Rab7 est bien établi pour la régulation du transport tardif (entre les LE et les lysosomes), plusieurs études récentes ont impliqué Rab7 dans des étapes plus précoces du transport vésiculaire : dans la maturation des EE en LE (Towbin et al., 1979) et dans le transport entre les EE et le réseau golgien (Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009).

Le rôle de Rab7 et Rab9 reste très peu décrit. Nous avons donc voulu caractériser le rôle de ces deux protéines dans le contrôle du transport du cholestérol.

Nous avons utilisé comme modèle cellulaire les cellules HeLa, modèle couramment utilisé en biologie cellulaire, dans lesquelles l'expression de nos protéines d'intérêt a été inhibée par ARN interférence. Nous avons aussi utilisé des cellules RPE1 (retinal pigment epithelial cells) qui sont particulièrement adaptées pour l'étude du transport intracellulaire des récepteurs des interférons. Dans ces conditions, nous avons tout d'abord étudié l'impact de l'inhibition de Rab7 et/ou Rab9 sur la distribution et le transport des LDL. Nous avons ensuite mesuré l'expression des gènes stérols-dépendants et l'activité de l'ACAT1. Des résultats particulièrement intéressants montrant le blocage de l'endocytose des LDL dès les EE lorsque Rab7 était inactivée nous ont poussés à étendre notre étude à d'autres cargos utilisant différentes voies de transport intracellulaire : MPR, transferrine (Tfn), IFNAR1 (interferon α receptor 1) et EGF. Enfin, nous avons étudié certaines protéines effectrices de Rab7 agissant dans le transport depuis les EE ou les LE pour mieux identifier la machinerie moléculaire qui détermine le rôle précoce ou tardif de Rab7.

Ce travail a fait l'objet d'une présentation orale lors du congrès du Club Endo-Exo qui a eu lieu à l'Isle-sur-la-Sorgue (France) du 31 mai au 2 juin 2012 et un article est actuellement en cours de rédaction pour soumission au Journal of Cellular Biology.

II. 1. Article 2

Early requirement of the small GTPase Rab7 for the endosomal sorting of low-density lipoproteins.

Girard E, Chmiest D, Fournier N, Johannes L, Paul JL, Védie B, Lamaze C.

En préparation

Early requirement of the small GTPase Rab7 for the endosomal sorting of low-density lipoproteins

E. Girard^{1,2,3,4}, D. Chmiest^{3,4}, N. Fournier^{1,2}, L. Johannes^{3,4}, J.L. Paul^{1,2}, B. Védie^{1,2} and C. Lamaze^{3,4}

¹ AP-HP (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris), Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Biochimie, 75015 Paris, France. ² Université Paris-Sud, EA 4529, UFR de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France. ³ CNRS UMR144, ⁴Institut Curie, Centre de Recherche, Laboratoire Trafic, Signalisation et Ciblage Intracellulaires, 75248 Paris Cedex 05, France.

Correspondence to C. Lamaze : christophe.lamaze@curie.fr or B. Védie : benoit.vedie@egp.aphp.fr

Abstract

The small Rab GTPases act as a molecular on/off switch and regulate various aspects of membrane transport through the recruitment of effector proteins. Among these Rab, Rab7 and Rab9 are known regulators of the endolysosomal network trafficking. In this study, we show that Rab7 inactivation led to the accumulation of LDL in abnormal enlarged late endosomes leading to the misregulation of cholesterol homeostasis. These effects were more pronounced when Rab9 was simultaneously silenced. Interestingly, a significant fraction of accumulated LDL were also trapped in enlarged early endosomes. Accordingly, we found that interference with Rab7 function led to the accumulation of CI-MPR, IFNAR1 and Tfn in enlarged early endosomes. These findings demonstrate that in addition to the transfer of cargo from LE to lysosomes, Rab7 is also required very early after the arrival of cargo into EE for proper endosomal maturation and trafficking.

Introduction

The endocytic pathway is a complex and highly regulated system that supports trafficking of nutrients and signaling cargos within cells (Huotari and Helenius, 2011). Early endosomes (EE) act as sorting stations that control and coordinate distinct trafficking steps in a temporal and spatial manner (Gurkan et al., 2005; Pfeffer and Aivazian, 2004).

Amongst the variety of proteins that regulate endosomal transport are the small molecular weight Rab family GTPases that cycle between GTP-bound active form and GDP-bound inactive cytoplasmic state (Stenmark, 2009). RabGTPases control vesicle budding, mobility, tethering and fusion along the exocytic and endocytic pathways. More than 60 human Rabs have been identified but there is still a lot to discover about their specific functions. The role of Rabs in endosomal trafficking is complicated as several of them show redundancy, and a single Rab GTPase can often regulate different steps of intracellular transport. Rab5 and Rab7 have been particularly well characterized for their role in endosome biogenesis and dynamics. Rab5 acts at early steps of endocytosis and is a *bona fide* marker of EE. It regulates the dynamics of clathrin-coated vesicles at the plasma membrane (McLauchlan et al., 1998; Semerdjieva et al., 2008) and controls their fusion with EE (Bucci et al., 1992). Rab7 is a marker of the late endosomes (LE) and is classically associated with the control of homotypic fusion between vacuoles and LE/lysosomes (Bucci et al., 2000), LE/lysosomes mobility (Vitelli et al., 1997) or autophagic maturation (Jager et al., 2004). More recently Rab7 has been shown to play a crucial role in the maturation process that transforms EE into LE. During this process, EE undergo a so-called Rab conversion where Rab5 is progressively replaced by Rab7 (Poteryaev et al., 2010; Rink et al., 2005). The conversion is initiated by Rab5-GTP that recruits the SAND-1/Mon1 complex and ccz1 that interact with components of HOPS (homotypic fusion and protein sorting) complex, which in turn recruits and activates Rab7. The SAND-1/Mon1 complex will then inactivate Rab5 through the displacement of a Rab5 guanine exchange factor, Rabex-5. Endosomal sorting and maturation is also tightly associated with the microtubule-dependent motility of endosomes from the periphery of the cell towards the perinuclear region

(Lakadamyali et al., 2006).

While it is known that endosomal transport plays a major role in the intracellular trafficking and cellular homeostasis of cholesterol, its regulation remains poorly understood (Ikonen, 2008). It is classically described that low-density lipoprotein (LDL) uptake through clathrin-dependent endocytosis of the LDL receptor (LDL-R) delivers cholesterol esters (CE) to the endolysosomal compartment after transiting through the EE. The delivery of CE to the endolysosomal network is a critical step since it allows to de-esterify CE into free cholesterol (FC) through the activity of acid hydrolases present in LE/lysosomes. FC will then reach other intracellular membranes, such as the recycling endosomes, mitochondria, the endoplasmic reticulum (ER), and the plasma membrane (Ikonen, 2008). The amount of FC reaching the ER is therefore a fine tuner of cholesterol intracellular homeostasis through FC re-esterification by the acyl cholesterol acyl transferase (ACAT) and regulation of sterol-sensitive genes by the transcription factor SREBP-2 (sterol-regulatory element binding protein 2). Indeed, we have recently shown that vesicular trafficking between the endolysosomal compartment and the ER controls the transcriptional regulation of cholesterol homeostasis in a dynamin-dependent manner (Girard et al., 2011).

In this study, we aimed to further characterize the role of endolysosomal trafficking in cholesterol transport and transcriptional regulation. We focused our study on Rab7, which is a major central regulator of endosomal membrane trafficking and more particularly of the LE/lysosomes network that plays a prominent role in cholesterol regulation. While Rab7 can be found on both EE and LE, most of the new Rab7 interactors identified recently are localized on LE (Wang et al., 2011). LDL is a cargo of choice for these studies since it is sorted and transported from the EE to the LE. Through RNA silencing and the use of constitutively active or inactive mutants, we could show that Rab7 is a major regulator of LDL sorting in late endosomes. Under Rab7 inactivation or depletion, we observed that LDL accumulated in enlarged endosomes and that the intracellular transport of FC was impaired. This led to a strong decrease of cholesterol esterification at the ER and to a defect in sterol-sensitive genes regulation. These effects that were synergized by the concomitant depletion of Rab9 are in agreement with the established role of Rab7 and Rab9 in

late endosomal trafficking. Interestingly, we found that Rab7 but not Rab9 depletion had a major effect on the sorting of LDL at the EE. This was not restricted to LDL since several cargos that are sorted at the EE were also affected by Rab7 depletion. Altogether our results confirm the role of Rab7 in late endosomal trafficking and the importance of the endolysosomal network in cholesterol trafficking and cholesterol homeostasis regulation. More importantly, our results indicate that Rab7 plays a critical role in early endosomal sorting and that the interplay between Rab5 and Rab7 occurs very early in the endosomal maturation process.

Results

Down-expression of Rab7 impairs LDL sorting and FC intracellular distribution

To better characterize the role of the small GTPases Rab7 and Rab9 in endosomal sorting, we depleted endogenous Rab7 and Rab9 using specific siRNAs and analyzed the effect on the intracellular transport of LDL. Transfection of siRNAs directed against Rab7 and/or Rab9 led to an almost complete depletion of mRNA as assessed by quantitative real-time PCR (Fig. 1E). The Rab7 siRNA also led to a decrease of Rab9 mRNA levels (almost 40%). These results were confirmed at the level of protein expression by western blot analysis (Fig. 1F).

We next analyzed the trafficking of fluorescently labeled LDL (DiI-LDL) and the intracellular distribution of FC in HeLa cells. After 3 h of continuous uptake, we observed that LDL accumulated into enlarged endosomes upon Rab7 silencing (Fig. 1A, top right). Rab9 silencing had no visible effect whereas silencing of both Rab7 and Rab9 accentuated the Rab7 depletion phenotype leading to the presence of LDL in bigger and more rounded endosomes (Fig. 1A, top right).

We stained the cells with filipin, a naturally fluorescent antibiotic that selectively binds to FC. FC also accumulated in enlarged endosomal structures upon Rab7 silencing (Fig. 1B, top right). Again Rab9 silencing alone had no visible effect while the accumulation of FC was enhanced with endosomes of larger size in cells depleted from both Rab7 and Rab9. Comparable results were obtained after 24 h of LDL uptake (data not shown).

To further confirm that the accumulation was due to the absence of functional Rab7, we over-expressed constitutively activated or inactivated mutants of GFP-tagged Rab7. As observed previously for the loss of Rab7, both FC and DiI-LDL were accumulated in enlarged endosomal structures (Fig. 1C and D) in cells expressing the inactive GDP-bound Rab7 mutant (GFP-Rab7-T22N). In contrast, when cells over-expressed the activated GTP-bound Rab7 mutant (GFP-Rab7-Q67L) no accumulation of LDL or FC could be evidenced. Thus, the loss or the inactivation of Rab7 result in the abnormal accumulation of internalized LDL and FC into enlarged endosomal structures.

Rab7 is required for the delivery of LDL-derived cholesterol to the ER and for the regulation of sterol-sensitive genes

The abnormal accumulation of LDL and FC into enlarged endosomes is likely to be the consequence of a block in endosomal transport. LDL uptake through clathrin-coated pits delivers lipoprotein-associated CE to EE and then to LE where it is de-esterified into FC. FC will reach the ER, the only organelle where FC can be esterified through ACAT activity. Thus, the measure of CE is an indirect but valid estimation of the amount of cholesterol transported from the late endosomal network to the ER (Du et al., 2012).

Cells were first depleted for lipids for 48 h by incubation with LPDS (Lipoprotein-deficient serum), and then incubated or not (control cells) for 24 h with LDL (200 µg/ml), before being quantified for cholesterol esterification by ACAT. In control cells, the total amount of CE measured by HPLC represented about 40% of the total cholesterol mass of the cell (Fig. 2A). This amount was significantly reduced (-30%) upon Rab7 silencing indicating that fewer FC was transported to the ER. The total amount of CE measured in the cell includes both the pool of CE that is re-esterified by the ACAT at the ER and the pool of CE that is present in the internalized LDL. We could specifically measure the amount of CE present in internalized LDL by pharmacological inhibition of ACAT activity (Fig. 2A, black bars). Under this condition, we observed an increase of the ACAT-independent pool of CE when Rab7 is silenced, which probably reflects the amount of CE present in the LDL that are blocked in the enlarged endosomes and therefore unable to be hydrolyzed by lysosomal esterases. We found again that Rab7 silencing reduced by 60% the amount of FC re-esterification by ACAT (Fig. 2A, grey bars). In contrast to the synergistic effect of Rab7 and Rab9 on cholesterol endosomal accumulation, we did not observe a further decrease in FC re-esterification when both Rab proteins were down-expressed. This suggests that Rab9 does not regulate the delivery of cholesterol to the ER, in agreement with the published role of Rab9 in regulating transport from the LE to the Golgi network (Barbero et al., 2002; Lombardi et al., 1993). Indeed, Rab9 silencing alone was not significantly different from the control condition.

We could confirm these results by measuring myristate esterification. Indeed, the endogenous amount of myristate esters is too low to be detected in the cell, and

by adding myristate, it becomes thus possible to selectively measure its esterification by ACAT in the ER. Consistent with the results on cholesterol esterification, we found again that Rab7 silencing blocked myristate esterification by about 50% and that Rab9 silencing had no effect (Fig. 2B). Altogether, these data indicate Rab7 activity is required for the efficient delivery of FC to the ER.

The delivery of FC from the endolysosomal network to the ER is key to cholesterol cell homeostasis (Girard et al., 2011; Robinet et al., 2006) since ER hosts the molecular machinery that controls cholesterol transcriptional regulation. We therefore examined if the loss of Rab7 could affect the regulation of sterol-sensitive genes in response to variations in cholesterol concentration. As expected in cells deprived of cholesterol, the addition of LDL resulted in the efficient down-expression of HMGCoAR (3-hydroxy-3-methyl CoenzymeA reductase), LDL-R and SREBF-2, the three major sterol-sensitive genes of the cell (Fig. 2C). In cells silenced for Rab7, the down-expression of these genes was strongly impaired. The down-regulation was decreased to only 42%, 59% and 32%, respectively, of the control cells. These down-regulation of these genes was not further impaired when both Rab7 and Rab9 were silenced simultaneously. Again, Rab9 silencing alone had no impact on sterol-sensitive genes down-regulation. These results are in agreement with the abovementioned effect of Rab7 depletion on cholesterol re-esterification and further confirm that Rab7 activity is required for the egress of FC from the endosomal network to the ER.

Loss of Rab7 leads to FC and LDL accumulation in both early and late endosomes

Rab7 has been classically involved in the regulation of intracellular trafficking between LE and lysosomes (Bucci et al., 2000; Ikonen, 2008; Vitelli et al., 1997). However, early reports have also localized Rab7 onto EE (Feng et al., 1995; Rink et al., 2005; Rojas et al., 2008).

To elucidate the nature of the enlarged endosomal compartment in which FC and internalized LDL accumulated, cells were co-labeled with *bona fide* fluorescent markers of EE and LE. In cells silenced for Rab7, we found that most (71% \pm 6) of internalized LDL were trapped in enlarged endosomal membranes positive for the LE/lysosomal marker Lamp1 (Fig. 3A, arrows), in agreement with the established role

of Rab7 in the regulation of transport between LE and lysosomes. More interestingly, a significant fraction of LDL ($40\% \pm 8$) was also trapped in enlarged EE as indicated by the positive staining for EEA1 (Fig. 3A, arrowheads). These observations were detectable more easily in the Rab7/Rab9 co-silencing condition because of the bigger size of endosomes (Fig. 3A, arrows and arrowheads). These results therefore suggest that Rab7 play a role in the sorting of LDL at the EE.

We further examined the morphology of the early and late endocytic compartments at steady state i.e. in the absence of added cholesterol (Fig. 3B). As expected for the loss of Rab7 activity, we found that LE/lysosomes were enlarged (Fig. 3B, arrows) and more dispersed than in control cells in agreement with previous reports (Rojas et al., 2008). We also found that the EE were enlarged (Fig. 3B, arrowheads) further suggesting that the loss of Rab7 affected early sorting in the endosomal network (Fig. 3B). These results were confirmed by the expression of the Rab7 constitutively inactive mutant. In cells expressing GFP-Rab7-T22N, both EE (arrowheads) and LE (arrows) were enlarged (Fig. 3C). Importantly, we could rule out an overall unspecific perturbation of the endosomal network since we observed no co-localization between EEA1 and Lamp1, an indication that EE and LE were still morphologically independent. In addition, we found that the enlarged endosomes were also positive for LysoTracker (Fig. 3D, arrowheads), indicating that those endosomes were still able to be acidified.

Taken together these results confirm that Rab7 depletion or inactivation result in the impairment of late endosomal trafficking, a role that has been established before by many investigators. More interestingly, our data suggest that Rab7 could also control the trafficking between early and late endosomes. These effects were also observed in the absence of LDL ruling out a nonspecific effect of cholesterol loading on intra-endosomal trafficking (Sobo et al., 2007).

Rab7 is required for cargo sorting at the early endosome

Our results indicate that Rab7 may play a role in the sorting of LDL from the EE. We therefore examined the effect of Rab7 depletion on LDL endocytosis (Fig. 4). Fluorescently labeled LDL were bound at 4°C and internalized for different times at 37°C. LDL are internalized through binding to the LDL-R and follow the classical

clathrin-dependent pathway (Goldstein et al., 1985). LDL were detected in small and disperse endosomes after 10 min of internalization in control cells. Immunolabelling confirmed that these endosomes were positive for EEA1 in agreement with the expected arrival of LDL in EE at this stage of endocytosis (Fig. 4A). Progressively, LDL were transported to later endocytic structures characterized by a perinuclear localization, and after 40 min of endocytosis, LDL co-localized mainly with Lamp1 positive endosomal structures (Fig. 4B). After 60 min uptake, LDL localized exclusively to LE/lysosomes and LDL were no longer detected in EEA1 positive endosomes (Fig. 4C). Under Rab7 silencing, LDL followed initially the same kinetics of uptake and the same intracellular distribution. However, as early as 10 min of endocytosis, we noticed that LDL were present in EEA1 positive endosomes that were bigger than those present in control cells (Fig. 4A, arrowheads). This phenotype was more pronounced at 40 min of endocytosis (Fig. 4B, arrowheads). At 60 min, there was still an important fraction ($70\% \pm 2$) of internalized LDL that were abnormally present in EE as shown by EEA1 staining (Fig. 4C, arrowheads). Such localizations were never observed in control cells. A fraction of the internalized LDL ($48\% \pm 9$) was also detected in Lamp1 positive endosomes after 60 min of endocytosis indicating that the endosomal trafficking was not totally blocked. These results are in favor of an early requirement of Rab7 in LDL sorting at the EE.

We next ask whether the early requirement of Rab7 was a particularity of the LDL sorting machinery or whether it could be generalized to other cargos. Therefore, we examined the endosomal distribution of four different transmembrane receptors that classically traffic through the EE, namely the cation-independent mannose-6-phosphate (CI-MPR), the transferrin (Tfn-R), the interferon- α chain1 (IFNAR1), and the epidermal growth factor (EGF-R) receptors.

Endosomal trafficking of the CI-MPR allows the retrieval of newly synthesized enzymes that have been post-translationally modified by a mannose-6-phosphate tag in the Trans-Golgi network (TGN) and are destined to the lysosome (Kornfeld, 1992). CI-MPR delivers lysosomal enzymes first to endosomes, from where they are transported along the endocytic pathway to the lysosomes, whereas the unoccupied CI-MPR is recycled back from endosomes to the TGN through retrograde trafficking (Arighi et al., 2004). There is still discussion as to whether CI-MPR trafficking to the

TGN occurs directly from EE or LE. To study CI-MPR transport, we first used HeLa cells stably expressing a GFP-tagged CI-MPR (Amessou et al., 2007). In control cells, the CI-MPR was present in the TGN at steady state (Fig. S1). Upon Rab7 silencing, we observed that in addition to its normal localization in the TGN, CI-MPR was also present in peripheral endosomes labeled for EEA1 (Fig. 5A, arrowheads). These data were further confirmed with anti-MPR antibody staining (Fig. 5B). These results show that Rab7 depletion blocks at least partially the retrieval of the CI-MPR from the EE to the TGN. This is in agreement with recent studies investigating the sorting machinery at the EE (Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009).

The Tfn-R is the prototypical receptor used to study constitutive recycling through the classical clathrin-dependent endocytosis (Mayle et al., 2012). After endocytosis, Tfn and its receptor are rapidly recycled to the plasma membrane directly from the EE or more slowly after transfer to the recycling endosome (van Dam and Stoorvogel, 2002). We tested whether the post-endocytic sorting of Tfn was affected by Rab7 silencing. Fluorescent Tfn was internalized for 45 min at 37°C. At this time, control cells accumulated Tfn into small peripheral endosomal structures that were not positive for EEA1, most probably corresponding to recycling endosomes. In Rab7 depleted cells however, Tfn was found into enlarged endosomal structures that were positive for EEA1 (Fig. 5C). As expected, the Tfn-R was present in the same enlarged endosomes after 45 min of endocytosis in Rab7 depleted cells (data not shown). These data suggested that Tfn-R recycling to the plasma membrane was affected by the loss of Rab7. We quantified the extent of Tfn recycling using flow cytometry in control or Rab7 depleted cells loaded with fluorescent Tfn for 45 min. In control cells, Tfn recycling occurred very rapidly and reached a plateau at 40 min. In contrast, Tfn recycling was substantially reduced in Rab7 silenced cells (Fig. 5D). Further supporting these data, we found that the amount of Tfn-R present at the cell surface as measured by antibody staining or Tfn binding at 4°C was reduced by about 30% at steady state in Rab7 silenced cells (Fig. 5E). These results indicate that the loss of Rab7 impairs the recycling of the Tfn-R to the plasma membrane.

We next examined whether endosomal sorting of signaling receptors was also affected by the loss of Rab7. We investigated the endosomal sorting of the interferon- α receptor, a transmembrane receptor, which in contrast to the Tfn-R,

undergoes ubiquitin-dependent lysosomal degradation after clathrin-dependent endocytosis (Kumar et al., 2007). To do so, we used RPE1 cells that express IFNAR in higher numbers than HeLa cells. After stimulation with IFN- α , the IFNAR1 chain of the receptor was blocked into enlarged endosomes after 40 min of endocytosis in Rab7 depleted cells (Fig. 5F, arrowheads). We observed a higher intensity of EEA1 staining, certainly reflecting the higher amount of activated Rab5 present on these endosomes (see discussion). In control cells, IFNAR1 was no longer associated with EE at this time. Altogether, these results indicate that Rab7 is required for the efficient sorting of both cargo and transmembrane receptors at the EE.

Role of early and late Rab7 interacting proteins in endosomal sorting

Our results indicate that in addition to its established role in late endosomal sorting, Rab7 is also involved in the regulation of the early endosomal sorting machinery. We next sought to evaluate the respective contribution of Rab7 in early versus late endosomal sorting for the transport and the transcriptional regulation of cholesterol. To do so, we specifically silenced some of the Rab7 effectors that are known to be present on EE or LE.

We first turned to VAMP (vacuolar associated-membrane protein) 7, a SNARE protein that interacts with Rab7 and mediates heterotypic fusion between LE and lysosomes (Pryor et al., 2004). We also studied Vps (vacuolar protein sorting) 26, a member of the retromer complex that interacts with Rab7 through the Vps35 subunit, and is involved in the control of retrograde transport of transmembrane proteins from EE to the TGN (Bonifacino and Hurley, 2008). As a control, we chose syntaxin 16 (STX16), a TGN-localized t-SNARE that regulates retrograde transport from the EE to the TGN but does not interact with Rab7 (Mallard et al., 2002). We could efficiently down-express the three effectors by RNAi treatment as shown by Western blotting (Fig. 6E). To further confirm the selectivity of Vps26 and STX16 silencing, we followed the intracellular distribution of the B-subunit of the Shiga toxin (STxB), a *bona fide* cargo of the retrograde transport between EE and the TGN (Johannes and Romer, 2010; Mallard and Johannes, 2003). In agreement with published data, we found that after 45 min of endocytosis, the arrival of StxB to the TGN was strongly impaired in cells silenced for Vps26 and STX16 (Fig. 6A)(Amessou et

al., 2007; Rojas et al., 2008). The intracellular distribution of the CI-MPR, which is also trafficked by retrograde transport to the TGN, was similarly affected (Fig. 6B)(Rojas et al., 2008; Seaman, 2004). Consistent with the findings that Rab7 controls the sorting of CI-MPR at the EE (Fig. 5A and C), StxB sorting to the TGN was also impaired by Rab7 silencing (data not shown). In agreement with the established role of VAMP7 in late endosomal transport(Chaîneau et al., 2009), VAMP7 silencing did not prevent the transport of STxB and the CI-MPR from the EE to the TGN (Fig. 6A and B).

We next examined the role of these effectors on LDL transport and FC delivery to the ER. Although the retromer complex interacts with Rab7 and regulates cargo sorting at the EE (Rojas et al., 2008), silencing of Vps26 had no major effect on LDL and FC intracellular distribution. We could notice however that the distribution of endosomes was slightly different from control cells, probably reflecting the role of Vps26 in early endosomal sorting. Nevertheless, we did not observe the abnormal accumulation of FC or LDL into enlarged endosomes as shown for Rab7 silencing (Fig. 6C and D). VAMP7 silencing caused a mild accumulation of FC and LDL in Lamp1 positive endosomes in agreement with the role of this SNARE protein in regulating vesicular trafficking between LE and lysosomes (Pryor et al., 2004). Again the phenotype was less severe than Rab7 silencing. Cells silenced for STX16 presented quite a different pattern since FC and LDL were localized in smaller and more dispersed endosomes (Fig. 6C and D).

To further understand the respective importance of Rab7 in early versus late endosomal sorting, we studied EGF (epidermal growth factor) trafficking (Fig. S2). In contrast to the Tfn-R that is constitutively internalized and recycled to the plasma membrane, the EGF-R undergoes lysosomal degradation after its endocytosis (Sorkin and Goh, 2009). To follow EGF intracellular transport and degradation, cells were incubated with fluorescent EGF for 15 min and then chased. In control cells, EGF was initially localized in small disperse endosomes before disappearing at 60 min as a result of lysosomal degradation. When Rab7 was silenced, EGF remained blocked in endosomal structures even after 90 min of chase (Fig. S2A). Accordingly, we observed that EGF-R degradation was delayed in Rab7 silenced cells (Fig. S2B). This is in agreement with the reported role of Rab7 in the transport of EGF from LE to lysosomes (Vanlandingham and Ceresa, 2009).

Finally, we evaluated the functional impact of Rab7-dependent endosomal sorting by monitoring the arrival of LDL-derived FC to the ER. Cells were depleted for lipids for 48 h by incubation with LPDS, and then incubated 24 h with LDL (200 $\mu\text{g/ml}$), before measuring the total amount of CE present in the cell. We found that under STX16 silencing the fraction of CE specifically generated by ACAT was decreased by two-fold as compared to the control (Fig.6F). Likewise the esterification of myristate was decreased to the same extent by STX16 silencing (data not shown) in agreement with a recent report involving STX16 in the retrograde transport of LDL-cholesterol (Urano et al., 2008). No measurable defects in cholesterol re-esterification could be evidenced when VAMP7 and Vps26 were knockdowned (Fig. 6F). However in VAMP7 depleted cells, we observed a dramatic increase (+ 95%) of the amount of CE present independently from the ACAT activity. This pool is likely to corresponding to CE present in LDL that are accumulated in endosomes as observed by immunofluorescence (Fig. 6D, arrowheads).

Discussion

Endocytosis is a highly dynamic and complex process that allows the rapid and efficient uptake of various cargos within the cell. Although endosomes are positioned immediately downstream of cargo uptake, the endosomal network has long been seen as a simple and passive continuum of the plasma membrane. Studies from the last ten years have revealed that the endosomal network is in fact a highly interconnected and dynamic system that is tightly coordinated with endocytosis and commands the intracellular fate of the internalized cargo. Endosome biogenesis and dynamics therefore play critical roles in signaling, cell growth, membrane turnover, pathogens survival, and many other aspects of cellular homeostasis (Huotari and Helenius, 2011). This is illustrated by the severity of the diseases involving mutations on genes regulating endosomal machineries (Ballabio and Gieselmann, 2009; Stein et al., 2003). In this context, our study provides the first evidence for a functional role of Rab7 in the transcriptional regulation of cholesterol homeostasis.

Several studies have recently characterized the endosomal sorting events that take place in the cell. New machineries including the retromer complex, the ESCRT (endosome-associated complex required for transport) machinery, sorting nexins or the WASH complex have been involved in the endosomal sorting of various molecules (Bonifacino and Hurley, 2008; Raiborg and Stenmark, 2009). Rab GTPases play also a critical role in endosomal biogenesis and dynamics. In this process, the Rab5 and Rab7 interplay has a very important role. The use of high resolution live cell imaging allowed the Zerial group to show in 2005 that the transformation of an EE into a LE is accompanied by the progressive replacement of Rab5 by Rab7, a process called Rab conversion (Rink et al., 2005). This molecular switch in early-to-late endosomal transition was recently confirmed in *C. elegans* with the identification of the Sand1/Mon1 complex as the complex controlling the Rab5 to Rab7 exchange (Poteryaev et al., 2010). Dmon1, the *Drosophila* ortholog of mon1/sand1, was recently reported to play a similar function in endosome formation and maturation (Yousefian et al., 2013). Studies on the role of Rab7 have led to conflicting results as regards to its function in the endocytic pathway. Most studies have shown that the activity of Rab7 is required at later steps when for cargo is transported from the LE to

the lysosomes (Ceresa and Bahr, 2006; Vanlandingham and Ceresa, 2009). A few other studies however have suggested that Rab7 may also control the transport of cargo from the EE to the LE (Feng et al., 1995; Rojas et al., 2008). A first example was provided by the Semliki Forest virus (SFV) that is endocytosed by clathrin-dependent endocytosis. The expression of the constitutively inactivated form of Rab7 resulted in SVF sequestration into EEA1 positive EE leading to the conclusion that Rab7 was recruited to early endosomal membranes and mediated the vesicular transport of the virus between EE and LE (Vonderheit and Helenius, 2005). However it was found lately that the transport of the EGF-R between EE and LE was not affected when Rab7 was silenced by RNAi treatment (Vanlandingham and Ceresa, 2009). In agreement with the classical function of Rab7, Rab7 silencing blocked the delivery of the EGF-R to the lysosome but did not affect its transport from the EE. Interestingly, the biogenesis of multivesicular bodies was not dramatically modified. Our results agree partially with this study since we also found that the population of Lamp1 positive endosomes was not significantly affected by the loss of Rab7 and that LE conserved their ability to be acidified. However, we also found that LDL were blocked in EEA1 positive endosomes upon Rab7 silencing. These discrepancies could be inferred to the cell system, the overexpression of Rab7 or the type of cargo studied. Our findings can rule out these possibilities since we found a similar effect on the sorting of the IFNAR1, and no difference between the Rab7 inactivated mutant and the Rab7 siRNA. Our data confirm a recent study involving Rab7 in the assembly of the retromer complex that mediates retrograde transport from EE to the TGN. The mammalian retromer complex consists of two sorting nexins and three vacuolar protein sorting 26/29/35 (Seaman, 2012). It was shown that Rab7 acts in concert with Rab5 to recruit the Vps subunits of the retromer complex to the endosome (Rojas et al., 2008). Thus, Rab7 silencing blocked the retrograde transport to the TGN of the CI-MPR, which accumulated into enlarged peripheral endosomes that remain positive for the Tfn-R several hours after CI-MPR endocytosis. These data together with those of (Rink et al., 2005) and (Poteryaev et al., 2010) have established the key role of the Rab conversion process in endosomal maturation, machineries recruitment, and cargo transport through the endosomal network. Whether Rab conversion occurs early or late in the endocytic process and whether it is required for EE to LE transport has not

been addressed by these studies. Indeed, recent studies suggest that the Rab5-Rab7 exchange occurs following LE maturation (Vanlandingham and Ceresa, 2009 ; Yousefian et al., 2013). Our results not only confirm the role of Rab7 in endosomal sorting, they reveal an early requirement for Rab7 activity in the transport of different cargos between the EE and the LE. In the absence of Rab7, Rab5 cannot be exchanged and remains abnormally activated resulting in increased recruitment of EEA1 and enlargement of the EE structure. Indeed, the expression of the constitutive activated form of Rab5-Q79L led to the same phenotype with enlarged endosomes positive for EEA1 (Fig. S3). This is also well illustrated in this study by the IFNAR1, which is completely blocked in enlarged endosomes highly positive for EEA1 after 40 min of endocytosis. The Rab conversion process is therefore immediately required after cargo arrival in the EE to ensure further efficient sorting to the LE. Under Rab7 silencing, we also found that a significant pool of LDL was trapped into a population of endosomes positive for Lamp1. In agreement with the hydrolysis of CE in the LE/lysosomes, we found that the enlarged endosomes induced by Rab7 silencing were stained by filipin and exclusively associated with Lamp1 (not shown). This indicates that in addition to its role in LDL transport from the EE, Rab7 also controls FC exit from the LE/lysosomes in agreement with its classical role in late endosomal transport. It was unexpected to find a significant population of LE containing LDL and FC under Rab7 silencing when LDL transport from EE to LE is inhibited. This significant proportion of remaining LE is unlikely to be due to insufficient Rab7 silencing. It is possible that other recycling pathways can contribute to LE biogenesis independently from Rab7. Our results with Rab9 silencing support the latter hypothesis. When Rab9 was silenced together with Rab7, we observed albeit not consistently that enlarged endosomes were in this case positive for both EEA1 and Lamp1 indicating that LE biogenesis and/or maturation was completely inhibited (data not shown). Rab5 plays a key role in assembling the endosomal transport machineries on the EE membranes (Bucci et al., 1992). One could therefore argue that the effects of Rab7 silencing could be an indirect consequence of a more general perturbation of the Rab5 dependent machinery. It is difficult to address this concern because of the intrinsic interplay between Rab5 and Rab7 and the dynamic continuum between EE and LE. In this context, it is interesting to note that RNA silencing against the three Rab5 isoforms *in*

vivo resulted in the almost complete disappearance of EE, LE and lysosomes (Zeigerer et al., 2012). Thus, the persistence of a significant population of acidic LE under Rab7 silencing is in favor of a selective effect on Rab7.

Our data confirm that endosomal sorting is a key actor in the transcriptional regulation of cholesterol homeostasis. We report here the first functional role of Rab7 in the regulation of the expression of three classical sterol-sensitive genes in response to variations in cholesterol intracellular concentration. The lack of gene down-expression in response to LDL-derived cholesterol uptake is a direct consequence of the abnormal retention in the EE of the cholesterol esters provided by internalized LDL, thereby preventing their hydrolysis into FC, a process that is mediated by the hydrolases present in the LE/lysosomes. This hypothesis was confirmed by the two-fold increase of the intracellular amount of CE measured independently of ACAT activity in Rab7 silenced cells. We observed a strong synergistic effect on endosomal morphology when Rab9 and Rab7 were silenced simultaneously. However, no synergistic effect was observed on cholesterol re-esterification and gene expression. Accordingly, Rab9 silencing alone had no effect on endosome morphology and sterol-sensitive genes regulation in agreement with previous results (Ganley and Pfeffer, 2006). Rab9 has been classically involved in the regulation of transport between LE and the TGN (Lombardi et al., 1993). The LE to TGN pathway has however been implied in the transport of LDL-derived cholesterol to the ER. RNAi silencing of the SNARE complex (VAMP4, syntaxin 6, and syntaxin 16) that selectively controls this pathway led to a strong decrease of the amount of cholesterol reaching the ER (Urano et al., 2008). We could confirm these results in our system with syntaxin 16 silencing. Rab9 was recently shown to participate with the retromer complex and the actin nucleator WASH in retrograde transport to the TGN in *Drosophila* suggesting that it could operate at the EE (Dong et al., 2013). The synergistic effect of Rab7 and Rab9 silencing on endosome size and LDL and FC accumulation is therefore a logical consequence of the inhibition of the two major exit pathways from both the EE and the LE. Our results are interesting in the context of the genetic Niemann-Pick disease type C where patient cells accumulate deleterious amounts of cholesterol and sphingolipids into the endolysosomal system (Ikonen and Holtta-Vuori, 2004; Vanier and Millat, 2003). The NPC phenotype is

reminiscent of the phenotype observed in cells silenced for Rab7. Interestingly, overexpressing Rab7 or Rab9 restored normal trafficking from LE to the ER in NPC1 human skin fibroblasts (Narita et al., 2005). Another study related to cholesterol disorders has shown that Rab7 gene expression was elevated in response to hypercholesterolemic diet and was found in atherosclerotic plaques (Kim et al., 2002).

In line with our results on the role of the EE in cholesterol trafficking, it was recently shown that Hrs/Vps27, a member of the ESCRT machinery, was required for trafficking of LDL-derived cholesterol from endosomes to the ER (Du et al., 2012). In agreement with the role of Rab7 in the endosomal recruitment of the retromer complex (Rojas et al., 2008), we found that silencing the retromer subunit Vps26 led to a reorganization of the endosomal distribution. However, Vps26 silencing had no significant effect on LDL endosomal accumulation and FC delivery to the ER. Nevertheless, we found a strong increase of the intracellular amount of ACAT-independent CE when syntaxin16 was silenced implying that the retromer complex does not control the early stages of LDL retrograde transport to the TGN. In agreement with the role of the VAMP7 SNARE in vesicular trafficking between LE and lysosomes, VAMP7 silencing led to a strong accumulation of CE into endosomes. There was however no significant effect on FC re-esterification indicating that alternate pathways are likely to deliver FC to the ER. These results illustrate the difficulty to functionally evaluate the impact of selective endosomal sorting machineries on cholesterol trafficking and homeostasis. It is likely that redundancy exists in cholesterol trafficking and that machineries can be shared between EE and LE along the endocytic continuum. This has been well exemplified by the Rab5-Rab7 conversion process and more recently by the HOPS and CORVET (class C core vacuole-endosome transport) complexes in yeast (Solinger and Spang, 2013). The strong phenotype observed in this study for Rab7 silencing is a likely consequence of the interaction of Rab7 with several actors of the endosomal sorting machinery both at the EE and LE levels. Our work confirms the intricate complexity of endosome dynamics and sorting and demonstrate that Rab7 is required very early after arrival of cargo into EE for proper endosomal maturation and trafficking.

Materials and methods

Cell culture

HeLa cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 100 UI/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Eurobio). HeLa cells stably transfected with GFP-CI-MPR were cultured in presence of 0.5 mg/ml of geneticin (G418) (Invitrogen)(Amessou et al., 2007). RPE1 cells were grown in DMEM F12 (Invitrogen) complemented with 10% FBS.

Antibodies and reagents

Monoclonal or polyclonal antibodies against TfR (Sigma), Lamp-1 and EGF-R(BD Biosciences), Golgin 97 (Molecular probes), CI-MPR, Vps26 and VAMP7 (Abcam), IFNAR1 (Biogen), STX16 (Synaptic system), EEA1, Rab7, Rab9 and actin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and Alexa488-, Cy3-and Cy5-coupled secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) were purchased from the indicated suppliers. Alexa Fluor 488- and 633-conjugated Tfn was from Invitrogen. Alexa Fluor 488-conjugated EGF was obtained from Invitrogen. STxB-Cy3 was prepared as previously described (Johannes et al., 1997). Dil-LDL were prepared with Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethyl-indocarbocyanine) (Sigma-Aldrich) and LDL as previously described (Girard et al., 2011).

RNA interference

ON-TARGET SMARTpools (Dharmacon), which are a mixture of four different oligonucleotides, were used to silence Rab7, Rab9 and VAMP7. For Vps26 and STX16, oligonucleotides were used individually (Amessou et al., 2007). Cells transfected with scramble siRNA were used as a control (siCtl). Vps26, STX16 and Ctl siRNAs were from Eurogentec. Cells were transfected with 25 nM siRNA using RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen). Experiments were carried out 48 h after transfection.

Cell transfection

Plasmids encoding GFP-Rab7-WT, GFP-Rab7-Q67L, GFP-Rab7-T22N and GFP-Rab5-Q79L were a gift from Stéphanie Miserey-Lenkei (Curie Institute, Paris, France). Transfection was done using FuGENE HD (Roche) according to the manufacturer's instructions. For each transfection, 2 µg/well of DNA was used in 6-well plates. Experiments were carried out 48 h after transfection.

RNA extraction, RT-PCR and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from cells using the RNeasy Mini kit (Qiagen). One microgram of total RNA was transcribed to cDNA using random hexamers (Amersham) and SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time quantitative PCR analyses were performed using the Sybr® Green reagents kit (Applied Biosystems) with an ABI PRISM 7900HT Sequence detector instrument (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Amplification was carried out in a final volume of 10 µL with 20 ng of cDNA, both sense and antisense primers (Eurogentec) in the Sybr® Green PCR Master Mix (Eurogentec). HMGCoAR, LDLR, SREBF-2 and UBC primer sequences were described previously (Robinet et al., 2006). Relative quantification for a given gene, expressed as fold-variation over control at T0, was calculated after normalization to a reference gene (UBC) and determination of the CT (cycle threshold) difference between conditioned cells and control cells at T0 using the comparative CT method (Biosystems, 2001). Efficiencies of the target and control amplification were similar.

Western Blotting

Cells were lysed in 1% triton X-100 in PBS containing protease inhibitor cocktail (Roche). Proteins (25 µg per lane) were resolved on precast Tris acetate gels (NuPAGE 3-8%) (Invitrogen) and transferred to PDVF membranes (Bio-Rad). Immunoblotting was performed by standard method. Blots were probed with specific antibodies or, as a loading control, an anti-actin antibody. Immunoreactive bands were visualized using ECL chemiluminescence kit (Amersham).

Immunofluorescence

Cells grown on glass coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Cell permeabilization was performed using 0.1% saponin for 15 min. Cells were incubated with primary antibodies diluted in 1% BSA in PBS for 1 h, followed by incubation with the appropriate conjugated secondary antibodies for 1 h. Cells were mounted with Mowiol (Beckman Coulter). Intracellular FC was visualized after freshly prepared 50 µg/ml filipin (Sigma-Aldrich) staining for 1 h at room temperature. LDL intracellular distribution was observed after 3 h incubation with 200 µg/ml Dil-LDL followed by fixation. Visualization of acidic organelles was performed by incubation of cells for 30 min with 200 nM LysoTracker DND-99 (Molecular Probes) prior to fixation.

Microscopy

Cells were imaged with an epifluorescent Leica microscope equipped with 63×/1.4 NAoil immersion objective and a coupled camera controlled by software (MetaMorph, Molecular Devices). Figures were assembled using Photoshop (Adobe). Confocal microscopy images were taken on a confocal laser-scanning microscope (Nikon). Camera and acquisition software used were the standard Nis-elements system software and camera. The objective used was a 63×/1.4 NAoil immersion objective. Images presented are representative of each sample analyzed.

Quantification of colocalization

For quantification, all images from a given experiment were acquired with the identical settings from the same microscope. Quantification of the co-localization of Dil-LDL with EEA1 or Lamp1 was performed on unprocessed images. The ImageJ software with the JACOP plugin (Bolte and Cordelières, 2006) was used to obtain the Pearson's correlation coefficient (PCC). The percentages of colocalization were obtained by multiplying PCC by 100 and were averaged from a total of 8-14 randomly selected cells.

LDL and Tfn uptake

For LDL uptake, cells grown on coverslips were incubated with Dil-LDL (200 µg/ml) in serum free medium for 40 min at 4°C and then shifted to 37°C for the indicated times, washed and fixed. For Tfn uptake, cells were incubated with Alexa Fluor 488-

conjugated Tfn (5µg/ml) for 1 h at 4°C and then shifted to 37°C for 45 min. Cells were washed and fixed. After fixation, cells were processed for immunostaining.

STxB and IFNAR1 internalization assay

1µM Cy3-STxB was added to the cells for 40 min at 4°C. Cells were washed and incubated for 45 min at 37°C before fixation. For IFNAR1 internalization assay, cells were incubated 40 min at 4°C with IFNAR1 antibodies, washed and incubated 40 min at 37°C in the presence of 1000 U/mL IFN β. Cells were fixed and stained with secondary antibodies.

Tfn binding and recycling

For Tfn binding, HeLa cells were incubated 1 h at 4°C with Alexa Fluor 633-conjugated Tfn. For Tfn-R binding, HeLa cells were incubated 1 h at 4°C with anti-Tfn-R antibodies. Cells were then incubated with secondary antibodies 1 h at 4°C. Cells were kept at 4°C until analysis. At least 10000 cells were analyzed on a FACSCalibur system (Becton Dickinson). For Tfn recycling, transfected cells were detached, washed and incubated for 45 min at 37°C in the presence of 5 µg/ml Alexa Fluor 633-conjugated Tfn. The cells were then placed on ice, washed, and resuspended in pre-warmed complete DMEM medium supplemented with Tfn. At the indicated times, aliquotes of cells were pelleted and analyzed on a FACSCalibur system (Becton Dickinson). At least 10000 cells were analyzed, and the mean Alexa-633 fluorescence was calculated. The values obtained at each time point were expressed as a percentage of the value measured at t = 0.

EGF endocytosis

HeLa cells were incubated 4 h in serum free medium and pulsed 15 min with 100 ng/ml Alexa Fluor 488-conjugated EGF. Cells were washed and chased for the indicated times at 37°C before fixation.

EGFR degradation assay

HeLa cells were pre-incubated for 1 h with cycloheximide (Sigma Aldrich) at 100 µg/ml. Cells were detached, washed and incubated for indicated times at 37°C in the

presence of 100 ng/ml EGF (Sigma Aldrich). The cells were then placed on ice, washed, and lysed. EGF-R levels were determined by Western blotting.

Cholesterol delivery to the cell

Human LDL ($d=1.019-1.063$ g/ml) were separated from fresh plasma by sequential ultracentrifugation as described previously (Robinet et al., 2006). HeLa cells deprived of sterols through incubation for 48 h in 10% LPDS medium were incubated for the indicated times with LDL (200 μ g/ml).

Measurement of cellular cholesterol

Cells transfected with the indicated siRNA were lysed in 0.2M NaOH. Total cholesterol was extracted with methanol (2.5 ml) followed by hexane (5 ml). 4.5 ml of the hexane phase was evaporated under vacuum and dissolved in mobile phase. Separation of FC and CE including cholesteryl docohexanoate (CDH), cholesteryl arachidonate (CA), cholesteryl linoleate (CL), cholesteryl myristate (CM), cholesteryl oleate (CO) and cholesteryl stearate (CS) was done by reverse phase HPLC on a C-18 column (25 x 0.46 cm length, 5- μ m pore size, Sigma-Aldrich) by measuring the 205 nm absorbance after elution with acetonitrile/isopropanol (30/70, v/v). The values were normalized to the total cellular protein level, which was measured using the bicinchoninic acid (BCA) method and expressed as the percentage of control.

ACAT activity

The ACAT inhibitor Sandoz 58-035 (Sigma-Aldrich) (10 μ g/ml) was added to the cholesterol loading medium. When ACAT activity is inhibited, CE are provided by pre-existing pools such as endocytosed LDL. Therefore, the difference in cholesterol esterification measured by HPLC with and without Sandoz 58-035 represents the specific amount of cholesterol esterified by the ACAT. The ACAT enzyme activity was evaluated by quantifying the incorporation of myristate into cholesteryl myristate by HPLC as described above. 120 μ M sodium myristate (Sigma-Aldrich) was added during cholesterol delivery to the cells.

Acknowledgements

We would like to thank F. Niedergang for help with the Tfn recycling assay and Stéphanie Miserey-Lenkei for providing reagents. This work was supported by institutional funds from the Curie Institute to CL. EG was supported by a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche and by FRM (Fondation pour la Recherche Médicale).

Abbreviation list

ACAT, acyl cholesterol acyl transferase; CE, cholesterol esters; CI-MPR, cation-independent mannose-6-phosphate receptor; CORVET, class C core vacuole-endosome transport; EE, early endosome; EGF, epidermal growth factor; EGF-R, epidermal growth factor receptor; ER, endoplasmic reticulum; ESCRT, endosome-associated complex required for transport; FC, free cholesterol; HMGCoAR, 3-hydroxy-3-methyl Coenzyme A reductase; HOPS, homotypic fusion and protein sorting; IFNAR1, the interferon- α chain 1; LDL, low-density lipoprotein; LDL-R, LDL receptor; LE, late endosome; LPDS, lipoprotein-deficient serum; SFV, Semliki Forest virus; SREBP-2, sterol-regulatory element binding protein 2; STX, syntaxin; STxB, β -subunit of the Shiga toxin; Tfn, transferrin; Tfn-R, transferrin receptor; TGN, trans-Golgi network; VAMP, vacuolar associated-membrane protein; Vps, vacuolar protein sorting.

References

- Amessou, M., A. Fradagrada, T. Falguieres, J.M. Lord, D.C. Smith, L.M. Roberts, C. Lamaze, and L. Johannes. 2007. Syntaxin 16 and syntaxin 5 are required for efficient retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. *J Cell Sci.* 120:1457-1468.
- Arighi, C.N., L.M. Hartnell, R.C. Aguilar, C.R. Haft, and J.S. Bonifacino. 2004. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol.* 165:123-133.
- Ballabio, A., and V. Gieselmann. 2009. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta.* 1793:684-696.
- Barbero, P., L. Bittova, and S.R. Pfeffer. 2002. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol.* 156:511-518.
- Biosystems, A. 2001. User Bulletin 2 : Relative quantification of gene expression. 11-15.
- Bolte, S., and F.P. Cordelieres. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc.* 224:213-232.
- Bonifacino, J.S., and J.H. Hurley. 2008. Retromer. *Curr Opin Cell Biol.* 20:427-436.
- Bucci, C., R.G. Parton, I.H. Mather, H. Stunnenberg, K. Simons, B. Hoflack, and M. Zerial. 1992. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell.* 70:715-728.
- Bucci, C., P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy, and B. van Deurs. 2000. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell.* 11:467-480.
- Ceresa, B.P., and S.J. Bahr. 2006. rab7 activity affects epidermal growth factor:epidermal growth factor receptor degradation by regulating endocytic trafficking from the late endosome. *J Biol Chem.* 281:1099-1106.
- Chaineau, M., L. Danglot, and T. Galli. 2009. Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. *FEBS letters.* 583:3817-3826.
- Dong, B., K. Kakiyama, T. Otani, H. Wada, and S. Hayashi. 2013. Rab9 and retromer regulate retrograde trafficking of luminal protein required for epithelial tube length control. *Nature communications.* 4:1358.
- Du, X., A.S. Kazim, A.J. Brown, and H. Yang. 2012. An essential role of Hrs/Vps27 in endosomal cholesterol trafficking. *Cell reports.* 1:29-35.
- Feng, Y., B. Press, and A. Wandinger-Ness. 1995. Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol.* 131:1435-1452.
- Ganley, I.G., and S.R. Pfeffer. 2006. Cholesterol accumulation sequesters Rab9 and disrupts late endosome function in NPC1-deficient cells. *J Biol Chem.* 281:17890-17899.
- Girard, E., J.L. Paul, N. Fournier, P. Beaune, L. Johannes, C. Lamaze, and B. Védie. 2011. The Dynamin Chemical Inhibitor Dynasore Impairs Cholesterol Trafficking and Sterol-Sensitive Genes Transcription in Human HeLa Cells and Macrophages. *PLoS One.* 6:e29042.
- Goldstein, J.L., M.S. Brown, R.G. Anderson, D.W. Russell, and W.J. Schneider. 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol.* 1:1-39.

- Gurkan, C., H. Lapp, C. Alory, A.I. Su, J.B. Hogenesch, and W.E. Balch. 2005. Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: the membrome. *Mol Biol Cell*. 16:3847-3864.
- Huotari, J., and A. Helenius. 2011. Endosome maturation. *EMBO J*. 30:3481-3500.
- Ikonen, E. 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:125-138.
- Ikonen, E., and M. Holtta-Vuori. 2004. Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Semin Cell Dev Biol*. 15:445-454.
- Jager, S., C. Bucci, I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami, P. Saftig, and E.L. Eskelinen. 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci*. 117:4837-4848.
- Johannes, L., and W. Romer. 2010. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nature reviews. Microbiology*. 8:105-116.
- Kim, J.Y., M.K. Jang, S.S. Lee, M.S. Choi, S.H. Bok, G.T. Oh, and Y.B. Park. 2002. Rab7 gene is up-regulated by cholesterol-rich diet in the liver and artery. *Biochem Biophys Res Commun*. 293:375-382.
- Kornfeld, S. 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem*. 61:307-330.
- Kumar, K.G., H. Barriere, C.J. Carbone, J. Liu, G. Swaminathan, P. Xu, Y. Li, D.P. Baker, J. Peng, G.L. Lukacs, and S.Y. Fuchs. 2007. Site-specific ubiquitination exposes a linear motif to promote interferon-alpha receptor endocytosis. *J Cell Biol*. 179:935-950.
- Lakadamyali, M., M.J. Rust, and X. Zhuang. 2006. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell*. 124:997-1009.
- Lombardi, D., T. Soldati, M.A. Riederer, Y. Goda, M. Zerial, and S.R. Pfeffer. 1993. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *Embo J*. 12:677-682.
- Mallard, F., and L. Johannes. 2003. Shiga toxin B-subunit as a tool to study retrograde transport. *Methods in molecular medicine*. 73:209-220.
- Mallard, F., B.L. Tang, T. Galli, D. Tenza, A. Saint-Pol, X. Yue, C. Antony, W. Hong, B. Goud, and L. Johannes. 2002. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol*. 156:653-664.
- Mayle, K.M., A.M. Le, and D.T. Kamei. 2012. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochim Biophys Acta*. 1820:264-281.
- McLauchlan, H., J. Newell, N. Morrice, A. Osborne, M. West, and E. Smythe. 1998. A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Current biology : CB*. 8:34-45.
- Narita, K., A. Choudhury, K. Dobrenis, D.K. Sharma, E.L. Holicky, D.L. Marks, S.U. Walkley, and R.E. Pagano. 2005. Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage. *Faseb J*. 19:1558-1560.
- Pfeffer, S., and D. Aivazian. 2004. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:886-896.
- Poteryaev, D., S. Datta, K. Ackema, M. Zerial, and A. Spang. 2010. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell*. 141:497-508.
- Pryor, P.R., B.M. Mullock, N.A. Bright, M.R. Lindsay, S.R. Gray, S.C. Richardson, A. Stewart, D.E. James, R.C. Piper, and J.P. Luzio. 2004. Combinatorial SNARE

- complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Rep.* 5:590-595.
- Raiborg, C., and H. Stenmark. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 458:445-452.
- Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis, and M. Zerial. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell.* 122:735-749.
- Robinet, P., A. Fradagrada, M.N. Monier, M. Marchetti, A. Cogny, N. Moatti, J.L. Paul, B. Védie, and C. Lamaze. 2006. Dynamin is involved in endolysosomal cholesterol delivery to the endoplasmic reticulum: role in cholesterol homeostasis. *Traffic.* 7:811-823.
- Rojas, R., T. van Vlijmen, G.A. Mardones, Y. Prabhu, A.L. Rojas, S. Mohammed, A.J. Heck, G. Raposo, P. van der Sluijs, and J.S. Bonifacino. 2008. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol.* 183:513-526.
- Seaman, M.N. 2004. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol.* 165:111-122.
- Seaman, M.N. 2012. The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci.* 125:4693-4702.
- Seaman, M.N., M.E. Harbour, D. Tattersall, E. Read, and N. Bright. 2009. Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J Cell Sci.* 122:2371-2382.
- Semerdjieva, S., B. Shortt, E. Maxwell, S. Singh, P. Fonarev, J. Hansen, G. Schiavo, B.D. Grant, and E. Smythe. 2008. Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J Cell Biol.* 183:499-511.
- Sobo, K., I. Le Blanc, P.P. Luyet, M. Fivaz, C. Ferguson, R.G. Parton, J. Gruenberg, and F.G. van der Goot. 2007. Late endosomal cholesterol accumulation leads to impaired intra-endosomal trafficking. *PLoS One.* 2:e851.
- Solinger, J.A., and A. Spang. 2013. Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS. *FEBS J.*
- Sorkin, A., and L.K. Goh. 2009. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Experimental cell research.* 315:683-696.
- Stein, M.P., J. Dong, and A. Wandering-Ness. 2003. Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Advanced drug delivery reviews.* 55:1421-1437.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:513-525.
- Urano, Y., H. Watanabe, S.R. Murphy, Y. Shibuya, Y. Geng, A.A. Peden, C.C. Chang, and T.Y. Chang. 2008. Transport of LDL-derived cholesterol from the NPC1 compartment to the ER involves the trans-Golgi network and the SNARE protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:16513-16518.
- van Dam, E.M., and W. Stoorvogel. 2002. Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell.* 13:169-182.
- Vanier, M.T., and G. Millat. 2003. Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet.* 64:269-281.

- Vanlandingham, P.A., and B.P. Ceresa. 2009. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem.* 284:12110-12124.
- Vitelli, R., M. Santillo, D. Lattero, M. Chiariello, M. Bifulco, C.B. Bruni, and C. Bucci. 1997. Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J Biol Chem.* 272:4391-4397.
- Vonderheit, A., and A. Helenius. 2005. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS biology.* 3:e233.
- Wang, T., Z. Ming, W. Xiaochun, and W. Hong. 2011. Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cell Signal.* 23:516-521.
- Yousefian, J., T. Troost, F. Grawe, T. Sasamura, M. Fortini, and T. Klein. 2013. Dmon1 controls recruitment of Rab7 to maturing endosomes in *Drosophila*. *J Cell Sci.*
- Zeigerer, A., J. Gilleron, R.L. Bogorad, G. Marsico, H. Nonaka, S. Seifert, H. Epstein-Barash, S. Kuchimanchi, C.G. Peng, V.M. Ruda, P. Del Conte-Zerial, J.G. Hengstler, Y. Kalaidzidis, V. Koteliensky, and M. Zerial. 2012. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature.* 485:465-470.

Legends

Figure 1. Loss of Rab7 activity causes LDL and FC accumulation in enlarged endosomes. (A) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 h, incubated for 3 h with 200 µg/ml DiI-LDL, and fixed. (B) HeLa cells transfected with the indicated siRNAs for 48 h were loaded with 200 µg/ml LDL for 3 h, and processed for filipin staining. Data are representative of at least three independent experiments. Scale bar, 10 µm. (C-D) HeLa cells were transfected for 48 h with plasmids encoding GFP-tagged active or inactive mutated forms of Rab7 as indicated. (C) Cells were loaded for 3 h with DiI-LDL (200 µg/ml) before fixation. (D) Cells were incubated 3 h with 200 µg/ml LDL and stained with filipin. Scale bar, 10 µm. n=2. (E-F) HeLa cells were silenced for Rab7 or/and Rab9 during 48 h. (E) Cells were lysed and analysed by quantitative real-time PCR for efficient silencing. Values of siCtl were arbitrarily set as 1, against which experimental data were normalized. The results are expressed as means + SD (error bars). n=3. (F) Efficiency of knockdown was analyzed by immunoblotting with Rab7, Rab9 or actin (loading control) antibodies. The blot shows a representative experiment. n=3.

Figure 2. Role of Rab7 on cholesterol esterification and sterol-sensitive genes regulation. (A) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 h, and incubated with 200 µg/ml LDL for 24 h. The amount of CE was quantified and expressed as the percent of the total amount of cell-associated cholesterol. ACAT-independent ester formation was measured in presence of 10 µg/ml ACAT inhibitor (black bars). n=3. (B) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 h, and incubated for 24 h with 200 µg/ml LDL and 120 µM sodium myristate. Cholesterylmyristate formation was measured and expressed in nmol/mg protein. n=3. (C) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 h. When indicated, cells were loaded with 200 µg/ml LDL for 24 h. Relative HMGCoAR, LDL-R and SREBF-2 RNAm levels were measured by real-time PCR. n=4.

Figure 3. Loss of Rab7 activity leads to the accumulation of LDL in both early and late endosomes. (A) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 h,

incubated for 3 h with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dil-LDL, and fixed. Arrowheads show colocalization between Dil-LDL and the endosomal marker EEA1. Examples of colocalization between Dil-LDL and Lamp1 are indicated by arrows. Representative images of at least 3 experiments are shown. Scale bar, 10 μm . (B) HeLa cells were transfected with Rab7 or control siRNA for 48 h, and processed for double-labelling with antibodies to EEA1 and Lamp1. Images show enlarged EE (arrowheads) and LE (arrows) in cells silenced for Rab7. Scale bar, 10 μm . $n=4$. (C) HeLa cells were transfected with plasmids encoding GFP-Rab7-WT or GFP-Rab7-T22N. After 48 h, cells were fixed, permeabilized and immunostained for EEA1 and Lamp1. Images show enlarged EE (arrowheads) and LE (arrows) in cells expressing Rab7-T22N. Scale bar, 10 μm . $n=2$. (D) After 48 h of transfection with Rab7 or control siRNA, HeLa cells were incubated for 30 min with 200 nM LysoTracker DND-99 before fixation. Cells were stained with anti-Lamp1 antibodies. Arrows point to enlarged acidified LE as shown by LysoTracker staining. Data are representative of two independent experiments with similar results. Scale bar, 10 μm .

Figure 4. Rab7 knockdown impairs LDL endocytosis. HeLa cells were transfected with Rab7 or control siRNA for 48 h and incubated with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dil-LDL for 40 min at 4°C. Cells were washed, incubated at 37°C for the indicated times and fixed. Cells were processed for immunofluorescent labelling with anti-EEA1 or anti-Lamp1 antibodies. Arrowheads denote enlarged EE containing Dil-LDL. Images show LDL endocytosis after 10 min (A), 40 min (B) and 60 min (C). Scale bar, 10 μm . $n=3$.

Figure 5. Rab7 is required for cargo sorting at the early endosome. (A) HeLa cells stably expressing GFP-tagged CI-MPR were transfected for 48 h with Rab7 or control siRNA. Cells were fixed and stained for EEA1. Colocalization of CI-MPR and EEA1 are indicated by arrowheads. Scale bar, 10 μm . $n=2$. (B) HeLa cells were transfected with Rab7 or control siRNA for 48 h, and analyzed for the steady-state distribution of CI-MPR by indirect immunofluorescent staining. Scale bar, 10 μm . $n=3$. (C) Control or Rab7 silenced HeLa cells were incubated 1 h at 4°C with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Alexa Fluor 488-conjugated Tfn. After Tfn uptake for 45 min at 37°C, cells were fixed, permeabilized and stained with antibody against endogenous EEA1. Scale bar, 10 μm . $n=3$. (D) HeLa

cells transfected with Rab7 or control siRNA for 48 h, were detached and resuspended in the presence of Alexa Fluor 633-conjugated Tfn for 45 min at 37°C. The recycling of Tfn was analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the percentage of the amount of recycled Tfn to the amount of internalized Tf. The results are expressed as means + SD (error bars). n=4. (E) After 48 h transfection with control or Rab7 siRNAs, HeLa cells were incubated at 4°C with 5 µg/ml Alexa Fluor 633-conjugated Tfn or antibodies directed against Tfn-R. The levels of Tfn and Tfn-R expression at the plasma membrane were measured by fluorescence (n=3). (F) Control or Rab7 silenced RPE1 cells were incubated for 40 min at 4°C with IFNAR1 antibodies. Cells were then incubated 45 min at 37°C in medium containing 1000 U/ml IFN β. Cells were fixed and stained with antibodies against IFNAR1 and endogenous EEA1. Arrowheads indicate the presence of IFNAR1 trapped in enlarged EE. Scale bar, 10 µm. n=2.

Figure 6. Early and late endosomal Rab7 effectors differentially affect LDL sorting. (A-E) HeLa cells were transfected for 48 h with control or VAMP7, VPS26, STX16 siRNAs as indicated. (A) Cells were incubated 40 min at 4°C with STxB-Cy3 and then chased 45 min at 37°C before fixation. Scale bar, 10 µm. n=2. (B) CI-MPR cellular distribution was observed by indirect immunofluorescent staining. Scale bar, 10 µm. n=2. (C-D) Cells were incubated for 3 h with 200 µg/ml LDL and processed for filipin staining (C) or incubated for 3 h with 200 µg/ml DiI-LDL and fixed (D). Examples of enlarged DiI-LDL-containing endosomes are indicated by arrowheads. Scale bar, 10 µm. n=3. (E) Efficiency of silencing was analyzed by immunoblotting with antibodies to VAMP7, VPS26 or STX16. The blot shows a representative experiment. n=2. (F) HeLa cells were transfected with VAMP7, VPS26, STX16 or control siRNA for 48 h, and incubated with 200 µg/ml LDL for 24 h. The amount of CE was quantified and expressed as the percent of the total amount of cell-associated cholesterol. ACAT-independent ester formation was measured in presence of 10 µg/ml ACAT inhibitor (black bars). n=3.

Figure S1. Rab7 is required for CI-MPR retrograde transport to the trans-Golgi network. HeLa cells stably expressing GFP-tagged CI-MPR were transfected for 48 h

with Rab7 or control siRNA. Cells were fixed and stained for Golgin97. Scale bar, 10 μm . n=2.

Figure S2. **Rab7 knockdown impairs EGF and EGFR degradation.** HeLa cells were transfected for 48 h with Rab7 or control siRNA. (A) Cells were incubated 15 min with 100 ng/ml Alexa Fluor 484-conjugated EGF, washed, and incubated for the indicated times at 37°C before fixation. (B) EGFR degradation assay was performed in control and Rab7 depleted HeLa cells. The blot shows a representative experiment. n=2.

Figure S3. **Dominant Rab5 active mutant affects LDL trafficking and FC intracellular distribution.** HeLa cells were transfected for 48 h with a plasmid encoding the GFP-tagged active mutated form of Rab5 as indicated. (A) For LDL distribution analysis, cells were loaded for 3 h with Dil-LDL (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) before fixation. For FC distribution analysis, cells were incubated 3 h with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LDL and stained with filipin. (B) Cells were incubated with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dil-LDL for 40 min at 4°C. Cells were washed, incubated at 37°C for 60 min and fixed. Cells were processed for immunofluorescent labelling with anti-EEA1 antibodies. Arrowheads denote enlarged EE containing Dil-LDL. Scale bar, 10 μm . n=2.

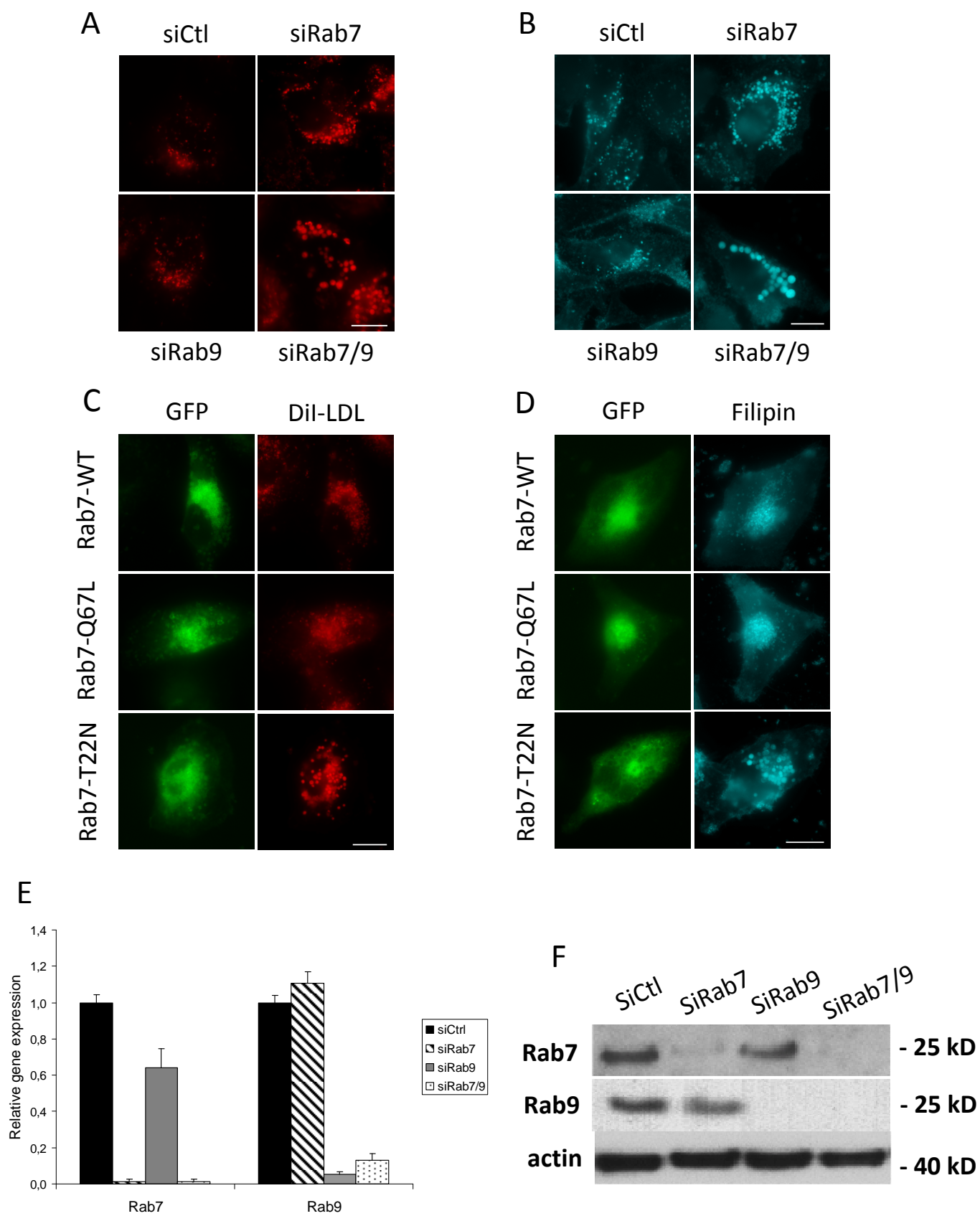


Fig 1.

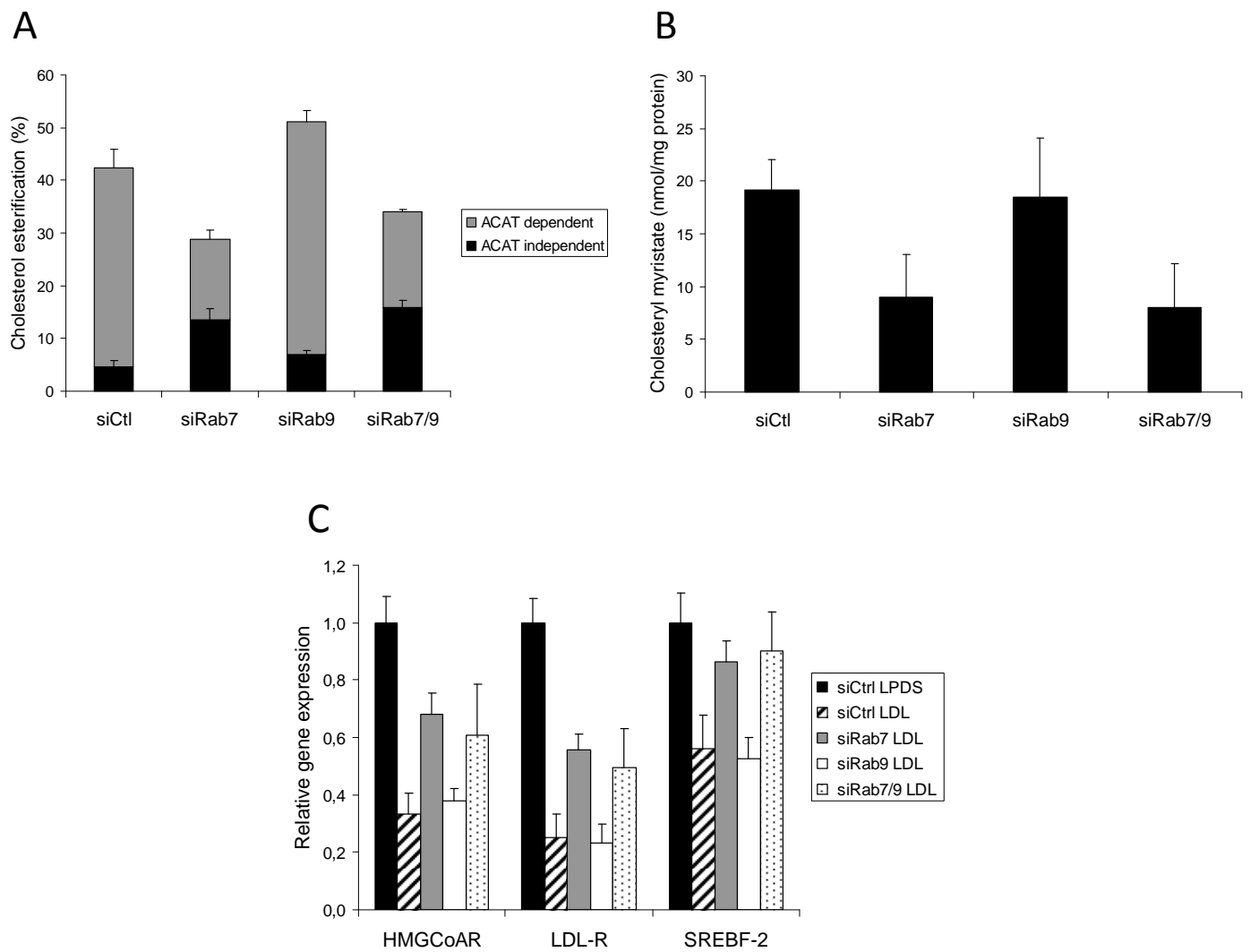


Fig 2.

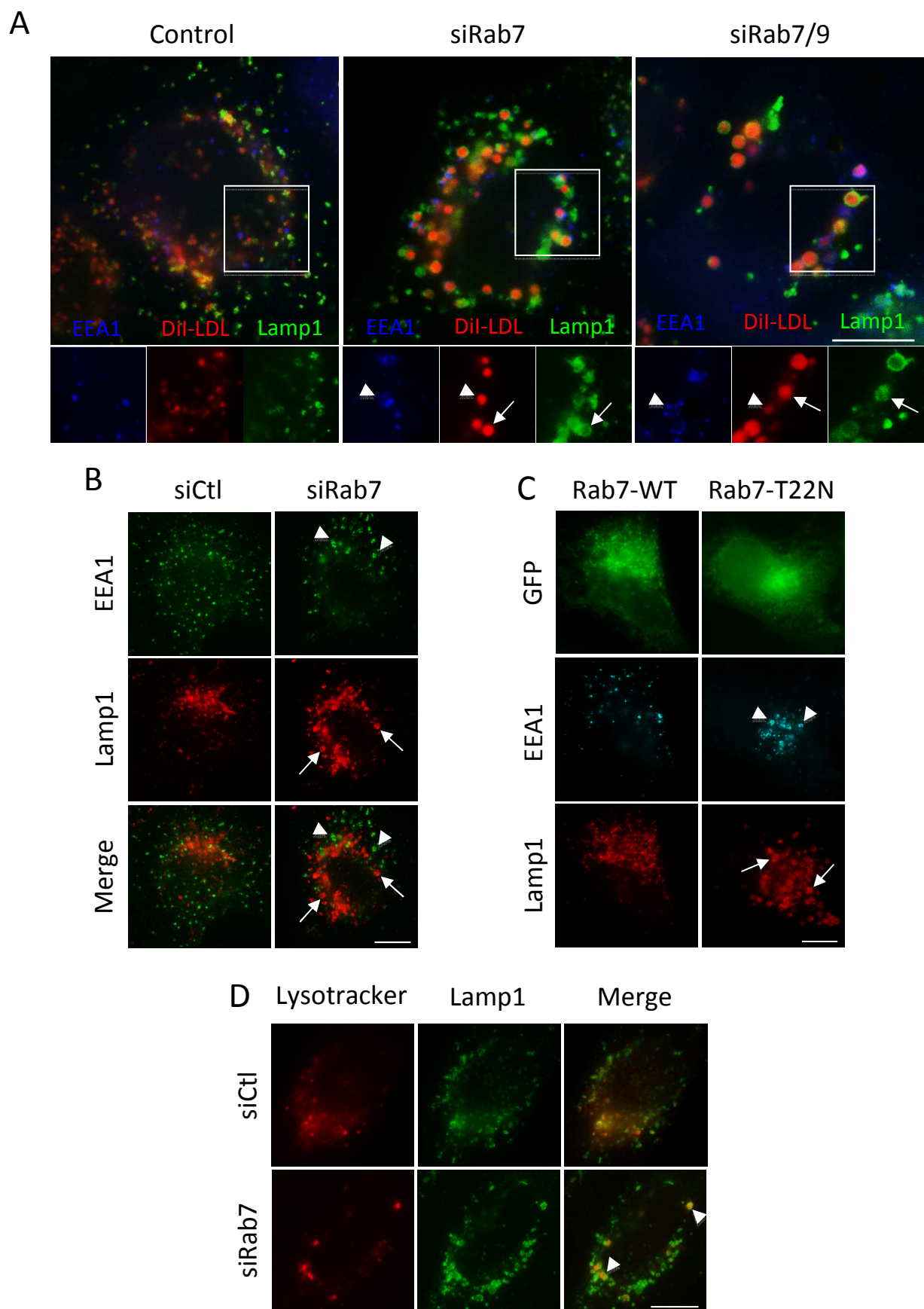


Fig 3.

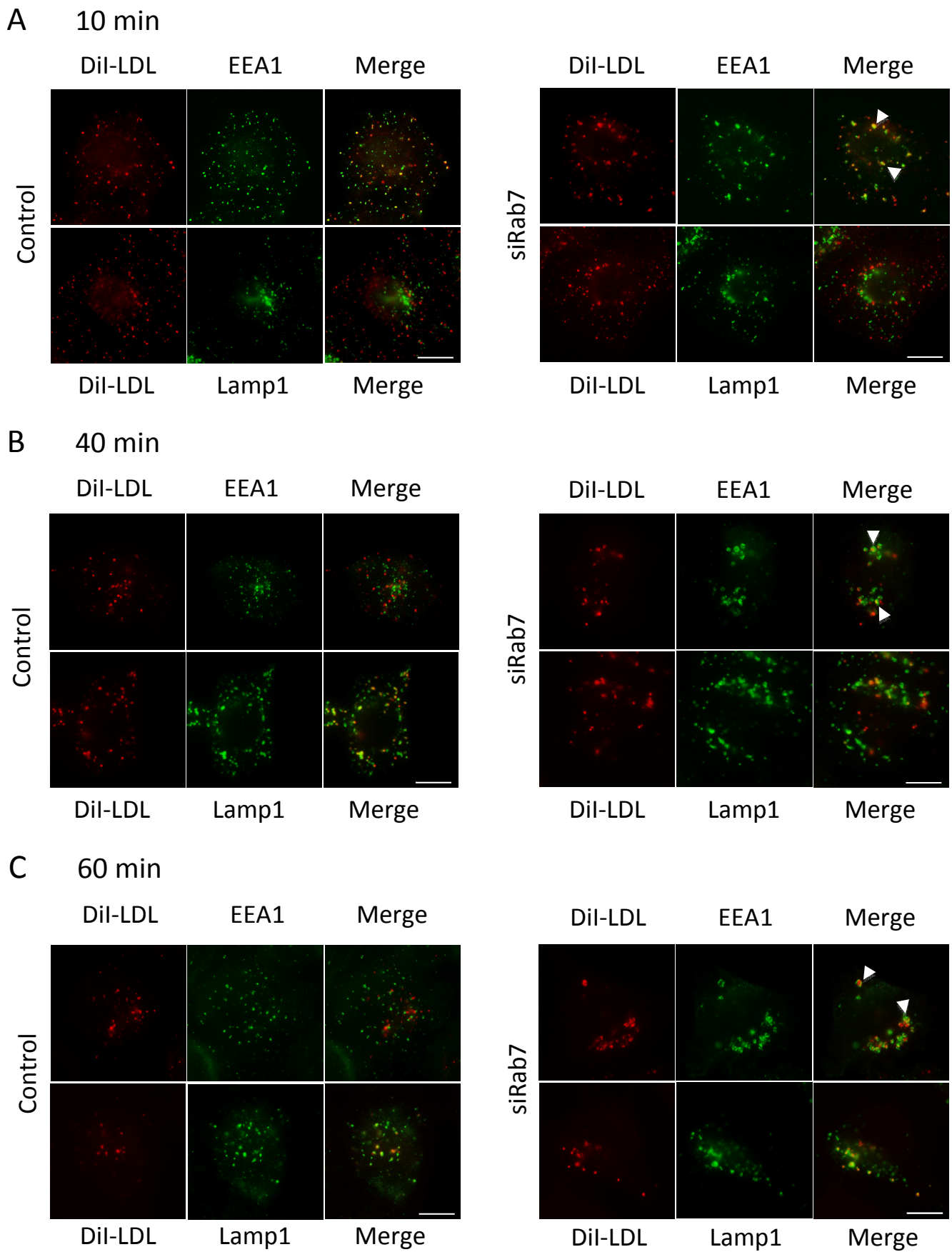


Fig 4.

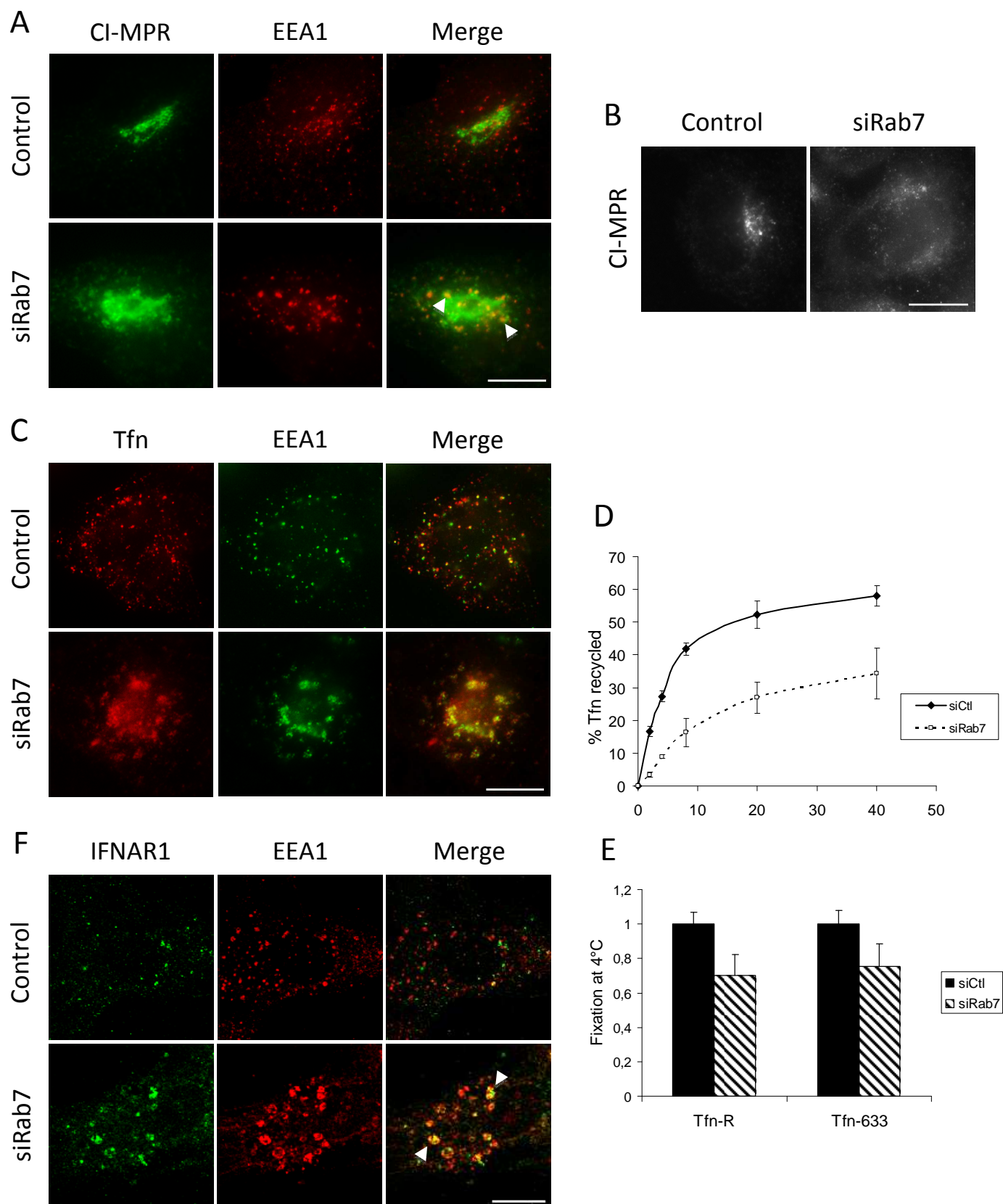


Fig 5.

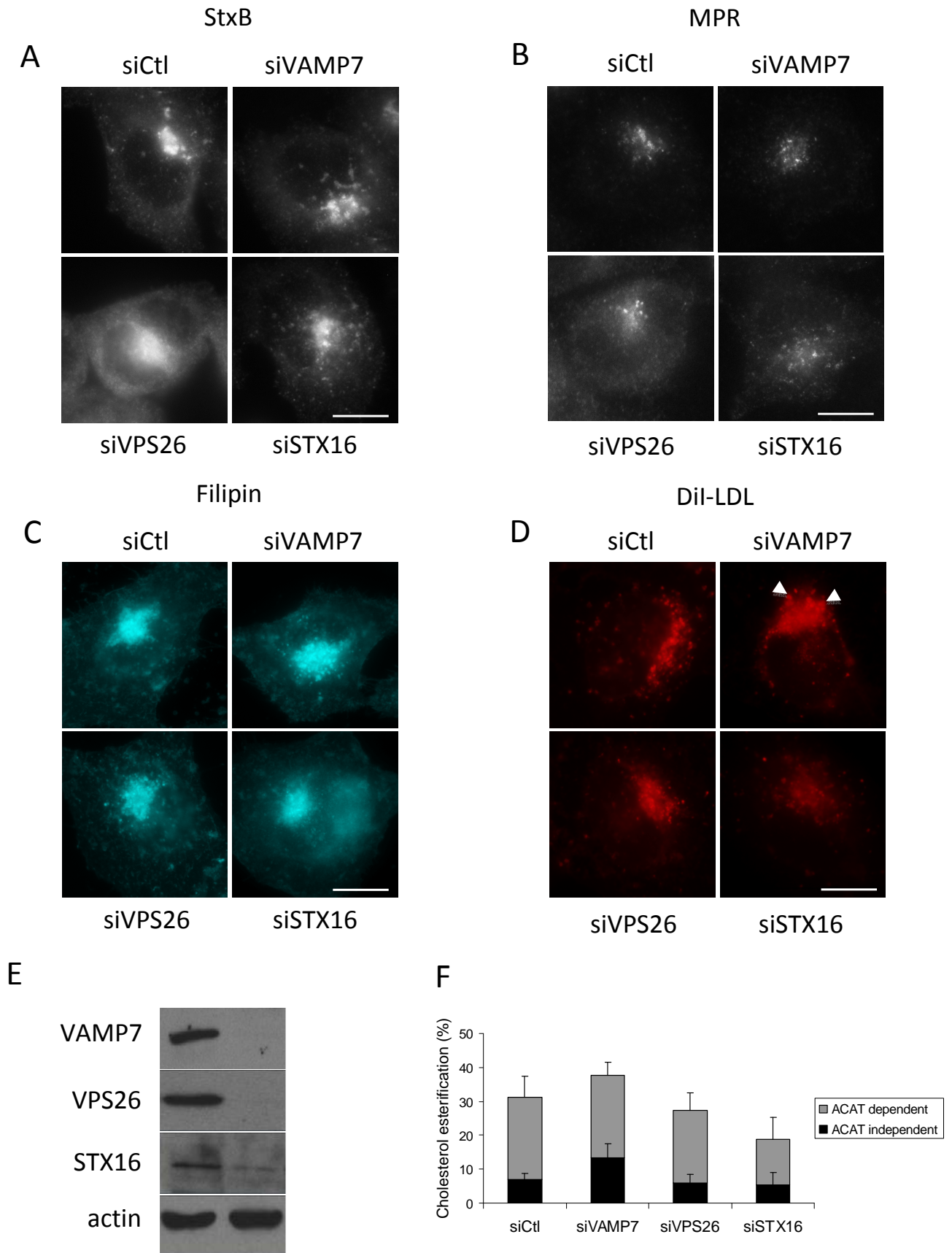


Fig 6.

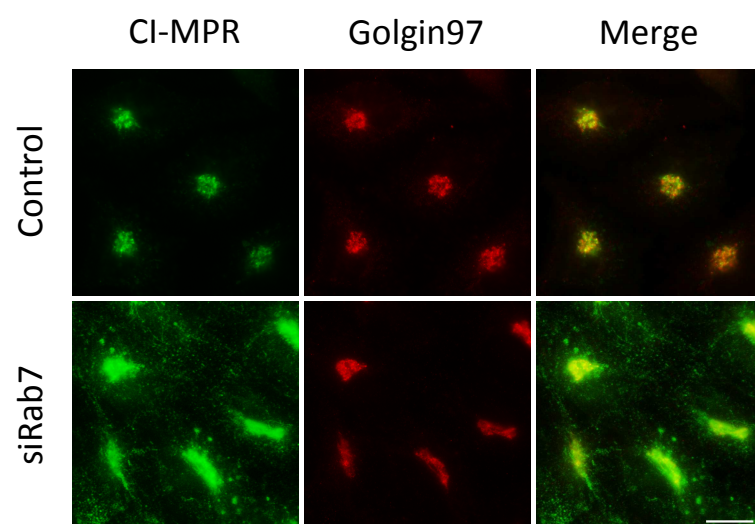


Fig S1.

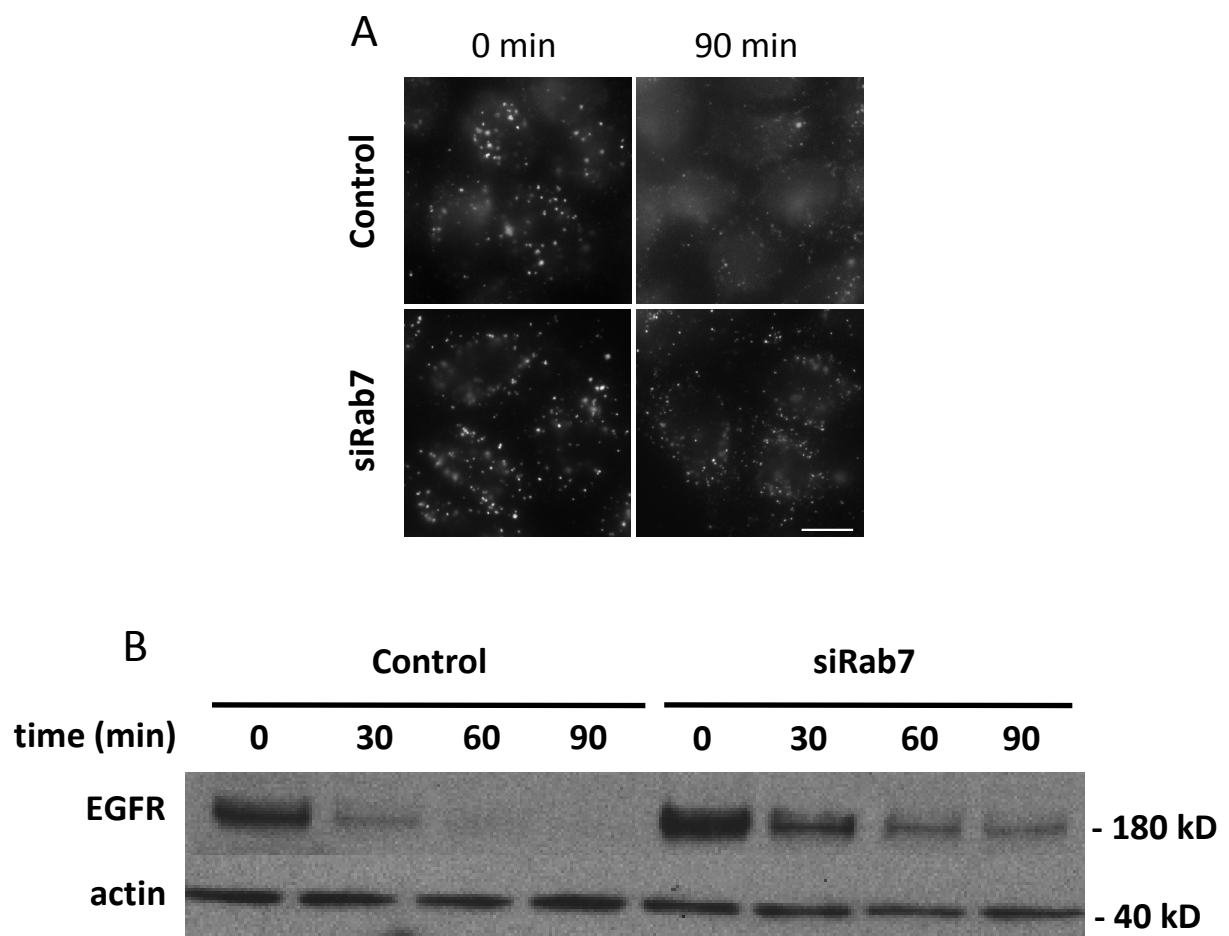


Fig S2.

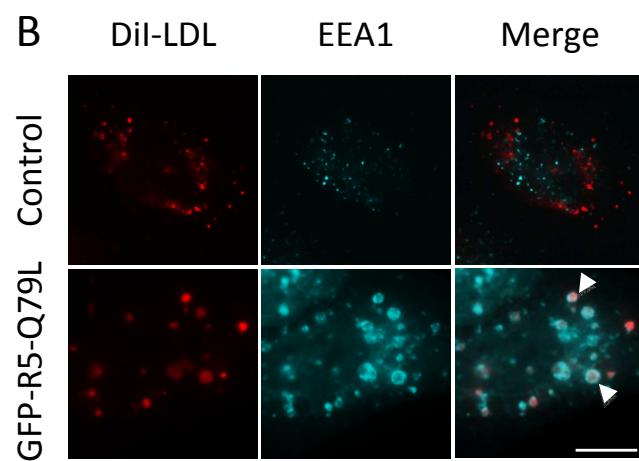
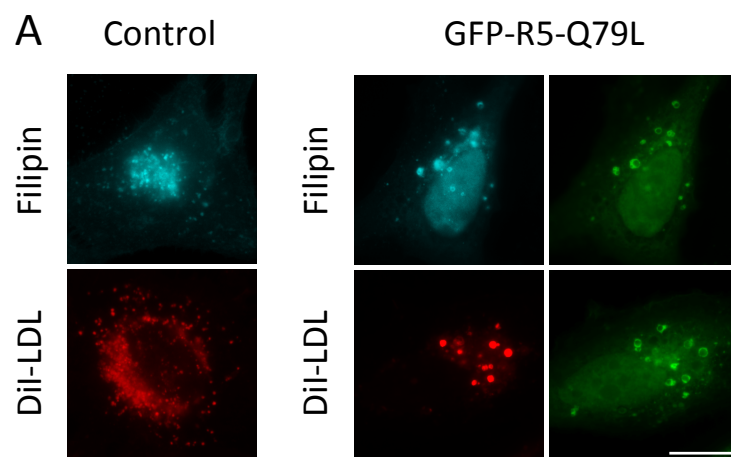


Fig S3.

II. 2. Résultats

Dans cette étude, nous avons utilisé l'ARN interférence et l'expression de mutants pour caractériser le rôle de Rab7 et Rab9 dans le transport intracellulaire du cholestérol.

Dans les cellules HeLa, nous avons montré que le cholestérol libre et les LDL s'accumulent dans des endosomes élargis lorsque Rab7 est inactivé ou non synthétisé (mutants et siRNA (small interfering RNA)). L'inactivation de Rab9 seul entraîne peu d'effets mais renforce ceux dus à l'inactivation de Rab7. Nous avons ensuite montré en mesurant l'estérification du cholestérol par l'ACAT1 et l'expression des gènes stérols-dépendants que l'arrivée du cholestérol au niveau du RE était réduite par l'inhibition de Rab7, et non de Rab9.

Pour mieux comprendre les perturbations induites par l'inactivation de Rab7, nous avons ensuite suivi l'endocytose des LDL dans nos cellules. Le co-marquage avec des marqueurs spécifiques des compartiments endosomaux précoces et tardifs nous a permis de montrer que les LDL sont bloquées très rapidement après leur endocytose dans les EE. Ces résultats indiquent que Rab7 pourrait jouer un rôle plus précoce dans la régulation du trafic que celui généralement admis (Ceresa and Bahr, 2006; Vanlandingham and Ceresa, 2009).

Nous avons confirmé ce rôle précoce de Rab7 dans le transport endosomal en étudiant d'autres cargos qui transitent dans l'EE. En suivant le transport du MPR, de la Tfn, et de l'IFNAR1 nous avons montré qu'ils s'accumulaient dans des EE élargis lorsque Rab7 est inhibée. Nous avons également mesuré par cytométrie de flux une diminution du recyclage de la Tfn suite au blocage de son transport. Nous avons de plus montré que la dégradation de l'EGF est ralentie suite à l'altération du transport endosomal causée par l'inactivation de Rab7.

Enfin, nous avons empêché par ARN interférence l'expression de Vps26 et VAMP7, deux protéines effectrices de Rab7 qui agissent respectivement au niveau précoce et tardif. Nous avons évalué l'impact de cette inhibition sur la distribution du cholestérol et sur la régulation de son homéostasie. Aucune des deux conditions n'a pu permettre de reproduire l'effet obtenu avec l'inactivation de Rab7.

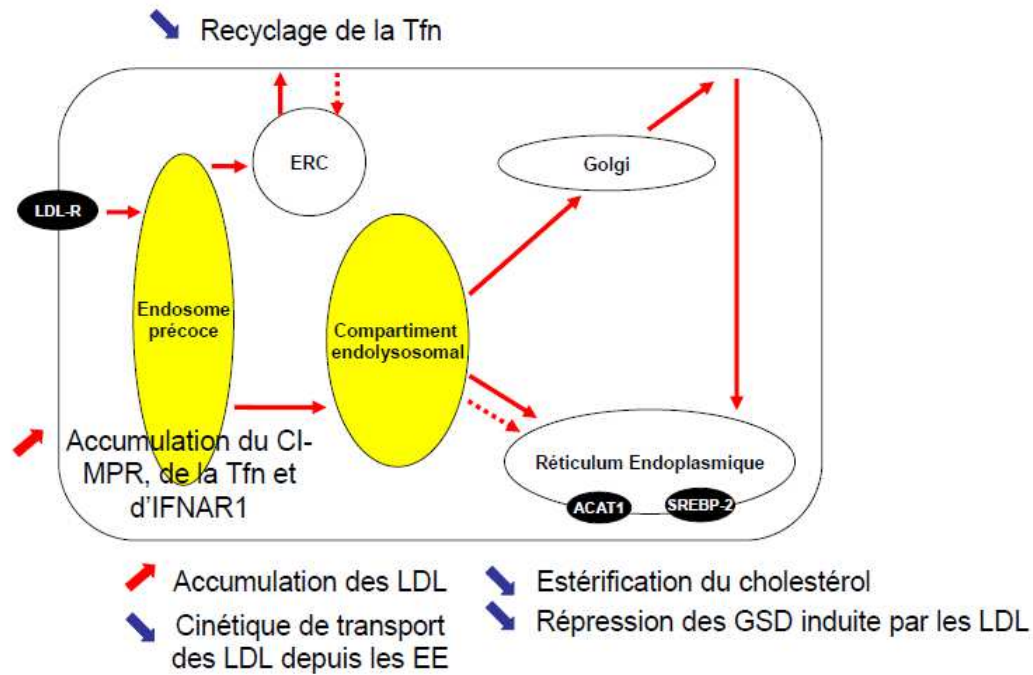


Figure 26 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'étude sur le rôle de Rab7 dans le transport endosomal dans les cellules HeLa

Dans les cellules HeLa, lorsque Rab7 est inactivée, le cholestérol s'accumule dans des endosomes élargis. Ces endosomes sont majoritairement des endosomes tardifs mais aussi des endosomes précoces. Ces résultats reflètent le ralentissement du transport des LDL dans le système endosomal. L'accumulation du cholestérol dans les endosomes entraîne la diminution de l'arrivée du cholestérol au RE ce qui a pour conséquence de réduire l'expression des gènes stéroli-dépendants ainsi que l'estérification du cholestérol. Le blocage du transport endosomal n'est pas spécifique du cholestérol puisque le CI-MPR, la Tfn et l'IFNAR1 sont aussi retrouvés accumulés dans des endosomes précoces élargis lorsque Rab7 est inactivée. En parallèle du blocage du transport de la Tfn, son recyclage est réduit. Les flèches pleines représentent les transports vésiculaires et les flèches en pointillés les transports non vésiculaires. ACAT1, acyl Coenzyme A:cholestérol acyl transférase 1; ERC, endosomal recycling compartment; GSD, gènes stéroli-dépendants; LDL, low density lipoprotein; LDL-R, LDL receptor; SREBP-2, sterol regulatory element binding protein 2.

II. 3. Discussion et perspectives

Ce travail a confirmé le rôle de Rab7 dans les étapes tardives du transport du cholestérol. Nous avons de plus mis en évidence le rôle fonctionnel de Rab7 dans le contrôle transcriptionnel de l'homéostasie du cholestérol et un rôle nouveau de Rab7 dans les étapes précoces de l'endocytose des LDL.

Après l'inactivation de Rab7 par ARN interférence ou par l'expression de mutants, nous avons mis en évidence l'accumulation d'une forte proportion des LDL dans des LE élargis. Ces résultats sont en accord avec le modèle classiquement admis que Rab7 régule le transport des cargos entre les LE et les lysosomes (Ceresa and Bahr, 2006; Vanlandingham and Ceresa, 2009). De façon moins classique, une fraction des LDL a également pu être localisée dans des EE élargis. Cette localisation semble indiquer que Rab7 pourrait intervenir dans la régulation de la sortie des LDL des EE. Afin de mieux caractériser le niveau d'action de Rab7, nous avons suivi l'endocytose des LDL dans les cellules où Rab7 était inactivée. Dès 10 minutes d'endocytose, nous avons observé que des LDL sont accumulées dans des EE élargis. En analysant des temps d'endocytose plus tardifs (40 et 60 minutes), nous avons mis en évidence la présence anormale de LDL dans des EE. En parallèle, nous avons montré que l'arrivée des LDL dans les LE est ralentie. Ces résultats témoignent d'un ralentissement du transport des LDL dans le système endosomal lors de l'inactivation de Rab7.

Ces résultats suggèrent que le ralentissement de la dégradation de l'EGF-R observé par Western blot est une conséquence du ralentissement du transport de l'EGF-R dans les endosomes. Pour confirmer cette hypothèse, nous étudierons par microscopie l'endocytose d'EGF fluorescent dans nos conditions expérimentales.

Nous nous sommes ensuite demandés si l'inactivation de Rab7 avait un impact spécifique sur le transport des LDL ou si nos résultats pouvaient indiquer un rôle plus général de Rab7 dans le transport endosomal précoce. Nous avons donc étendu notre étude à d'autres cargos connus pour transiter dans les EE. Les différents cargos étudiés (MPR, Tfn, Tfn-R et IFNAR1) ont tous été retrouvés accumulés dans des EE précoces élargis lorsque Rab7 était inactivée indiquant que Rab7 est nécessaire pour la sortie de ces cargos des EE.

Sachant que la Tfn et son récepteur sont rapidement recyclés depuis les EE (Jeon and Osborne, 2012), nous avons analysé si le blocage de la Tf dans les EE modifie son recyclage. Nous avons donc évalué le recyclage de la Tfn par cytométrie de flux. Le recyclage de la Tfn est réduit d'environ 40% lorsque Rab7 est inactivée par rapport à la

condition contrôle. Ces résultats sont importants car ils montrent l'impact fonctionnel de l'altération précoce du transport de la Tfn. Nous souhaitons donc confirmer nos résultats par l'utilisation d'une deuxième technique de quantification du recyclage de la Tfn (Tfn-biotinylée couplée à un dosage ELISA). Nous validerons également l'effet de Rab7 sur la voie de recyclage en suivant par immunofluorescence le recyclage du LDL-R grâce à des anticorps spécifiques.

Le MPR utilise la voie de transport rétrograde entre les EE et le TGN (Arighi et al., 2004). En montrant que le MPR est bloqué dans les EE, nous avons confirmé les résultats impliquant Rab7 dans le recrutement du complexe rétromère et précisé que ce recrutement se faisait au niveau de l'EE (Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009).

Lorsque nous avons analysé la distribution du cholestérol libre, mis en évidence par marquage à la filipine, nous avons observé son accumulation dans des endosomes élargis. Cette accumulation a lieu presque exclusivement dans des endosomes Lamp1 positifs indiquant que le cholestérol libre est bloqué dans des LE. Dans nos conditions expérimentales, les cellules contiennent très peu de cholestérol libre d'origine endogène. Le cholestérol libre marqué par la filipine provient donc de l'hydrolyse des LDL incubées avec les cellules. Ces résultats nous permettent d'envisager que malgré l'altération du transport des LDL, leur hydrolyse a toujours lieu.

L'avantage de l'utilisation des LDL comme cargo d'étude est que nous avons pu quantifier l'impact fonctionnel du transport des LDL sur la régulation de l'homéostasie du cholestérol. Nous avons ainsi montré que l'accumulation des LDL dans les endosomes suite à l'inactivation de Rab7 provoque la dérégulation de l'expression des gènes stérols-dépendants, ainsi que la diminution de l'activité de l'ACAT1. Ces résultats mettent en évidence pour la première fois le rôle fonctionnel de Rab7 dans l'arrivée des pools régulateurs du cholestérol au RE. La diminution de la régulation de l'homéostasie du cholestérol n'étant toutefois pas totale (-50% pour l'expression des gènes en moyenne et -50% pour l'activité de l'ACAT1), on peut en déduire que d'autres voies (vésiculaires ou non vésiculaires) permettent l'arrivée du cholestérol vers le RE. Il faut aussi considérer l'hypothèse que malgré une inhibition de plus de 99% des ARNm codant pour Rab7 une fraction de la protéine reste fonctionnelle et permet l'arrivée partielle du cholestérol au RE.

Au cours de cette étude, nous avons également étudié le rôle de Rab9 dans le transport intracellulaire du cholestérol. L'inactivation de Rab9 n'induit pas de modification significative de la distribution des LDL et du cholestérol libre. L'arrivée du cholestérol au RE pour la régulation des gènes stérols-dépendants et son estérification n'est pas modifiée. Une étude avait déjà suggéré que Rab9 n'est pas essentiel à la sortie du cholestérol des LE (Ganley

and Pfeffer, 2006). Ces résultats ainsi que les nôtres indiquent que la voie de transport dépendante de Rab9 n'est pas la voie principale de transport du cholestérol vers le RE.

Nous savons que Rab7 et Rab9 sont présentes au niveau de la membrane des LE, Rab7 régulant le transport vers les lysosomes alors que Rab9 agit sur la voie de transport vers le TGN (Barbero et al., 2002; Vanlandingham and Ceresa, 2009). Nous avons voulu savoir si lorsque l'une des deux Rab était inactivée la deuxième pouvait compenser pour assurer la sortie du cholestérol du compartiment endolysosomal. Nous avons donc inactivé simultanément les deux Rab. Sur le plan phénotypique, nous avons observé un effet synergique de l'accumulation des LDL et du cholestérol libre avec la présence d'endosomes élargis de taille plus importante. Cette synergie peut logiquement être expliquée par le fait que les deux voies principales de sortie du cholestérol du compartiment endolysosomal sont bloquées. En revanche, l'inactivation simultanée de Rab7 et Rab9 ne modifie pas plus l'expression des gènes stérols-dépendants et l'activité de l'ACAT1 que l'inhibition isolée de Rab7. Ces résultats prouvent que par rapport à Rab9, Rab7 est un facteur limitant de l'arrivée du cholestérol au RE.

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'effet de Rab7 sur la sortie des cargos des EE était lié au rôle de Rab7 dans la maturation endosomale. En effet, Rab7 a récemment été décrite comme impliquée dans la maturation des EE en LE (Towbin et al., 1979). Cette étape de transition est contrôlée par un switch Rab5/Rab7 : cela signifie qu'il est nécessaire qu'en parallèle de l'inactivation de Rab5, Rab7 soit recruté.

Nous avons donc observé par immunomarquage la structure des EE et des LE. L'inactivation de Rab7 par ARN interférence ou expression du mutant inactif de Rab7 conduit à l'élargissement des EE et des LE. La colocalisation des marqueurs précoces et tardifs est très rare indiquant que les deux types d'endosomes restent structurellement indépendants. Nous avons de plus confirmé que les LE sont toujours acidifiés puisque marqués par le LysoTracker, un témoin de l'acidification des endosomes. Nous tenons à souligner que cet effet est indépendant de l'accumulation de cholestérol dans les endosomes puisqu'observé même en absence de LDL. L'ensemble de ces résultats semble donc indiquer que la maturation endosomale n'est pas totalement altérée lorsque Rab7 est inhibée en accord avec les résultats de B. P. Ceresa (Vanlandingham and Ceresa, 2009).

Sachant le rôle majeur de Rab7 dans la maturation endosomale, nos résultats peuvent sembler surprenants. Cependant, il a été montré chez Levure que l'inhibition d'un facteur régulateur de la maturation endosomale, Vsp39, peut être inhibé par ARN interférence sans pour autant bloquer totalement la maturation endosomale (Towbin et al., 1979).

L'élargissement des LE suite à l'inactivation de Rab7 avait déjà été décrit dans d'autres études (Vanlandingham and Ceresa, 2009). Cet élargissement peut être attribué à l'absence

de fusion des LE avec les lysosomes. Est-il aussi possible d'expliquer l'élargissement des EE ? Etant donné le fait que Rab7 est nécessaire pour l'inactivation de Rab5, il semble probable qu'en absence de Rab7, Rab5 ne soit plus inactivé au niveau de la membrane des EE et que cela induise l'élargissement des EE. C'est ce que nous avons montré en surexprimant dans nos cellules un mutant actif de Rab5 et en montrant qu'EEA1, un effecteur de Rab5, était toujours recruté à la membrane des EE élargis.

Il existe un risque que les résultats que nous observons ne soient pas spécifiques de l'inactivation de Rab7 mais liés à une inhibition complète de la fonction endosomale suite à la suractivation de Rab5. Nous souhaitons donc vérifier si les « Rab domains », témoins de la fonctionnalité des endosomes (Sonnichsen et al., 2000) sont toujours présents au niveau de la membrane des EE élargis. Pour cela, nous ferons exprimer à bas niveaux des formes GFP de Rab4 et Rab5 en condition d'extinction de Rab7. Si des « Rab domains » peuvent être mis en évidence, cela pourrait indiquer que malgré leur altération structurale les EE élargis conservent leur fonctionnalité.

Dans la dernière partie de cette étude, nous avons examiné si le rôle précoce et le rôle tardif de Rab7 pouvaient être reliés à des effecteurs connus pour interagir avec Rab7 au niveau de l'EE et de LE respectivement. Pour analyser le rôle tardif de Rab7, nous avons choisi d'étudier VAMP7. VAMP7 est une SNARE connue pour réguler les étapes de fusion des LE avec les lysosomes (Pryor et al., 2004). Malgré l'accumulation de LDL dans des LE élargis reliée à une forte augmentation des EC ACAT-indépendants, l'inhibition de VAMP7 par ARN interférence n'a qu'un effet modéré sur l'estérification du cholestérol. Cet effet modéré de l'inactivation de VAMP7 semble indiquer que l'effet Rab7 dans le transport et l'homéostasie du cholestérol est du à son rôle précoce dans le transport endosomal.

Nous avons ensuite étudié l'impact de l'inhibition de la voie rétrograde sur le transport du cholestérol. La voie rétrograde a été inhibée en inactivant Vps26, l'une des protéines de la sous-unité de reconnaissance du complexe rétromère. Que ce soit sur le plan phénotypique ou quantitatif, l'inactivation de Vps26 ne semble pas avoir d'effet.

En revanche, l'inactivation de STX16, une SNARE qui contrôle la fusion avec des vésicules avec le Golgi, provoque un phénotype tout à fait différent de celui observé dans les autres conditions. Les LDL ainsi que le cholestérol libre sont distribués dans des endosomes plus fins et plus dispersés que la condition contrôle. L'arrivée du cholestérol au RE est réduite de manière très importante comme le montre la forte diminution (-50 %) de l'activité de l'ACAT1. Pour expliquer ces résultats, nous proposons que l'inhibition de STX16 bloque la fusion des vésicules avec le Golgi et empêche ainsi le transport du cholestérol par la voie majoritaire classique entre les LE et le Golgi. Il a déjà été montré par Urano et coll. que l'inactivation de

STX16 empêche le transport du cholestérol dérivé des LDL jusqu'au Golgi (Urano et al., 2008).

Ce travail montre la complexité du rôle de Rab7 qui agit à différents niveaux du transport cellulaire et contrôle plusieurs voies de transport. Les résultats indiquent que la maturation endosomale intervient très rapidement après l'arrivée du cargo dans les EE. Cependant, la maturation ne semble pas nécessaire à la formation des compartiments tardifs mais plutôt pour le transport vers ces compartiments.

III. Macrophages

Nous avons montré dans notre modèle de cellules HeLa que l'inhibition de Rab7 par ARN interférence provoque le blocage du transport du cholestérol. Ce modèle cellulaire, nous a permis de mettre en évidence un rôle plus précoce de Rab7 dans le transport endosomal.

Nous avons ensuite voulu voir si les perturbations observées dans les cellules HeLa suite au blocage de Rab7 entraînaient les mêmes effets dans un modèle cellulaire plus adapté à l'étude des phénomènes impliqués dans l'athérosclérose tels que les macrophages.

Nous avons donc étudié l'impact de l'inhibition de Rab7 sur le transport et l'homéostasie du cholestérol dans des macrophages humains.

Parmi les différents modèles cellulaires de macrophages humains, les cultures primaires de macrophages humains nous ont semblé plus aptes à refléter les mécanismes physiopathologiques. En effet, de plus en plus de données montrent que les résultats obtenus sur des lignées humaines ne correspondent pas aux résultats obtenus sur les cellules primaires. Cependant l'utilisation de ces cellules comporte plusieurs inconvénients : les cultures primaires sont plus difficiles à transfecter que les lignées, elles nécessitent des délais de culture plus longs et surtout, il peut exister une hétérogénéité des cellules selon le donneur utilisé pour obtenir les monocytes.

Après inhibition de Rab7 et/ou Rab9 par ARN interférence, nous avons étudié la distribution du cholestérol par immunofluorescence. Nous avons également évalué l'arrivée du cholestérol au niveau des membranes du RE en mesurant l'expression des gènes stérols-dépendants par PCR en temps réel (RT-PCR, real time PCR) et en évaluant l'activité de l'ACAT1 par CLHP (chromatographie liquide haute pression). Enfin, nous avons apprécié l'impact fonctionnel de cette inhibition sur l'efflux du cholestérol par l'apo AI.

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale lors du congrès de la NSFA (Nouvelle Société Française d'Athérosclérose) qui a eu lieu à Avignon (France) du 16 au 18 juin 2011.

III. 1. Résultats

Dans un premier temps, nous avons validé l'inhibition de nos protéines d'intérêt Rab7 et Rab9 dans notre modèle de macrophages humains. Pour cela, nous avons transfecté pendant 48 heures nos cellules avec les même siRNA que ceux utilisés dans les cellules HeLa. Nous avons également utilisé le même agent de transfection, la lipofectamine RNAiMAX. Nous avons quantifié par RT-PCR quantitative les ARNm codant pour Rab7 et Rab9. En utilisant une concentration plus importante (50 nM) que dans les cellules HeLa, nous avons atteint une inhibition de plus de 80% et 70% respectivement (Figure 25 A). Dans la condition siRab7/9, nous avons aussi obtenu une inhibition satisfaisante (80% et 65%). L'inhibition des Rab a été confirmée au niveau protéique par Western blot à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre Rab7 et Rab9 (Figure 25 B).

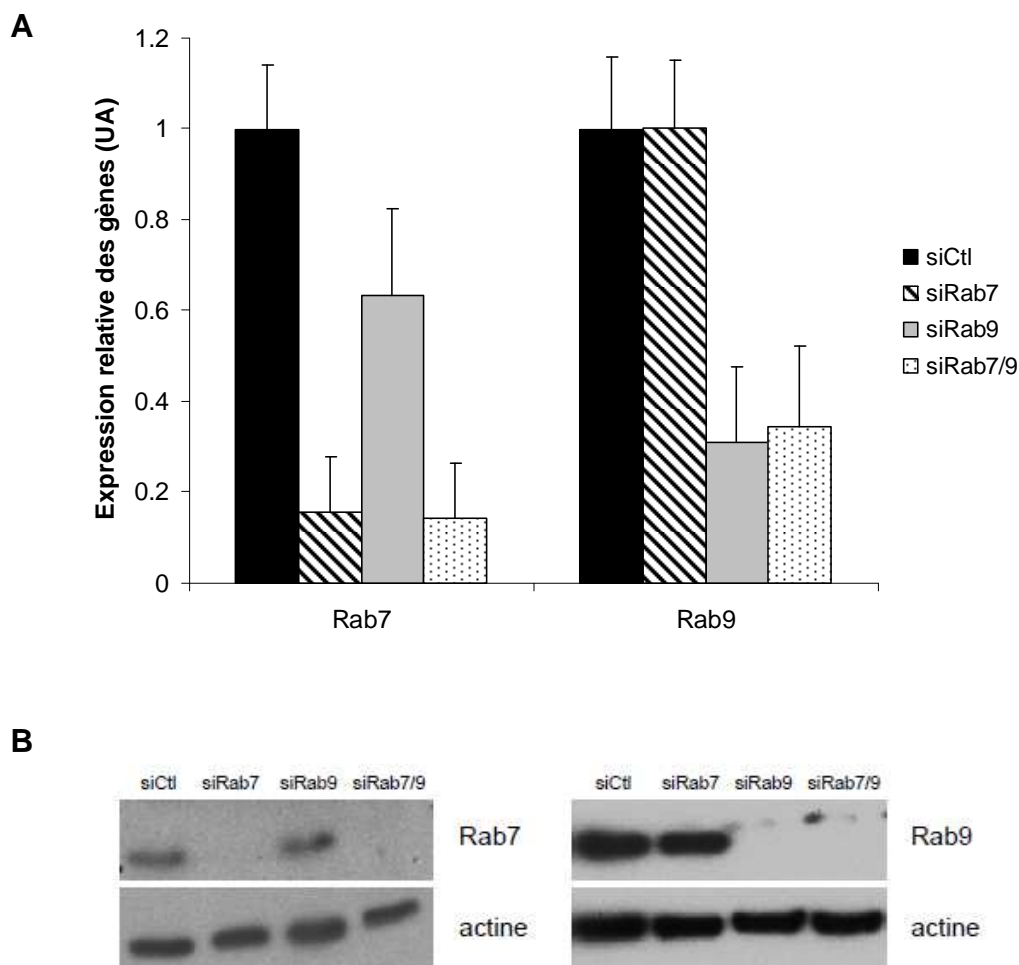


Figure 27 : Validation de l'inhibition de Rab7 et Rab9 dans les HMDM

A. La quantification des ARNm a été réalisée par RT-PCR quantitative avec pour gène de référence UBC. Les valeurs du siCtl sont arbitrairement fixées à 1. Les variations d'expression des gènes sont rapportées à la condition siCtl après normalisation. Chaque valeur est la moyenne \pm ET de 4 expériences. B. Le niveau d'expression des protéines Rab7 et Rab9 est évalué par Western blot. Le blot est représentatif de 3 expériences indépendantes.

Nous avons ensuite étudié la distribution des LDLac fluorescentes (LDLac-Dil) et du cholestérol libre marqué par la filipine dans les HMDM après l'inhibition de Rab7 et/ou Rab9. Nous avons montré que l'inactivation de Rab7, comme dans les cellules HeLa, conduit à l'accumulation des LDLac et du cholestérol dans des endosomes élargis (Figure 26). Aucune différence significative n'a pu être observée suite à l'inhibition de Rab9. En revanche, l'inactivation simultanée de Rab7 et Rab9 est synergique comme le montre la taille plus importante des endosomes.

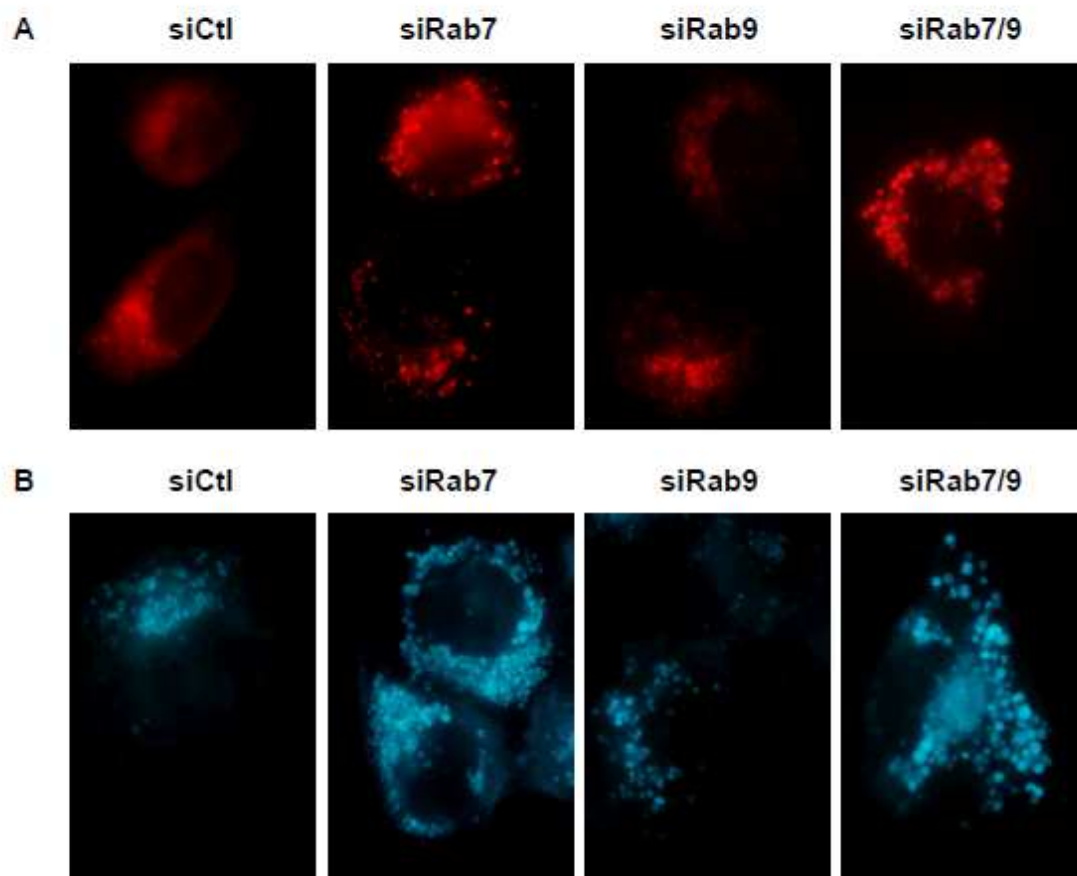


Figure 28 : Impact de l'inhibition de Rab7 et/ou Rab9 sur la distribution des LDLac et du cholestérol libre dans les HMDM

A. Pour la distribution des LDLac, les HMDM ont été incubés pendant 3 heures avec 50 μ g/ml de LDLac-Dil. B. Pour le cholestérol libre, les cellules ont été incubées pendant 3

heures avec 50 µg/ml de LDLac puis incubées avec de la filipine. Les images sont représentatives des résultats obtenus lors de 2 expériences indépendantes.

Pour savoir si le blocage du transport du cholestérol a un impact sur l'arrivée du cholestérol au niveau du RE, nous avons quantifié d'une part, la variation d'expression des gènes stérols-dépendants et, d'autre part, l'estérification du cholestérol. Comme attendu après 24 heures de surcharge avec des LDLac, l'expression des gènes stérols-dépendants est diminuée (Figure 27). Cette répression est légèrement diminuée dans les conditions siRab7 et siRab7/9 (-25% pour HMGCoAR, -8% pour LDL-R et -14% pour SREBF-2). L'inactivation de Rab9 seul n'a pas d'effet significatif sur l'expression des gènes stérols-dépendants. Ces résultats sont sensiblement identiques à ceux observés dans les cellules HeLa mais avec des variations beaucoup plus modérées.

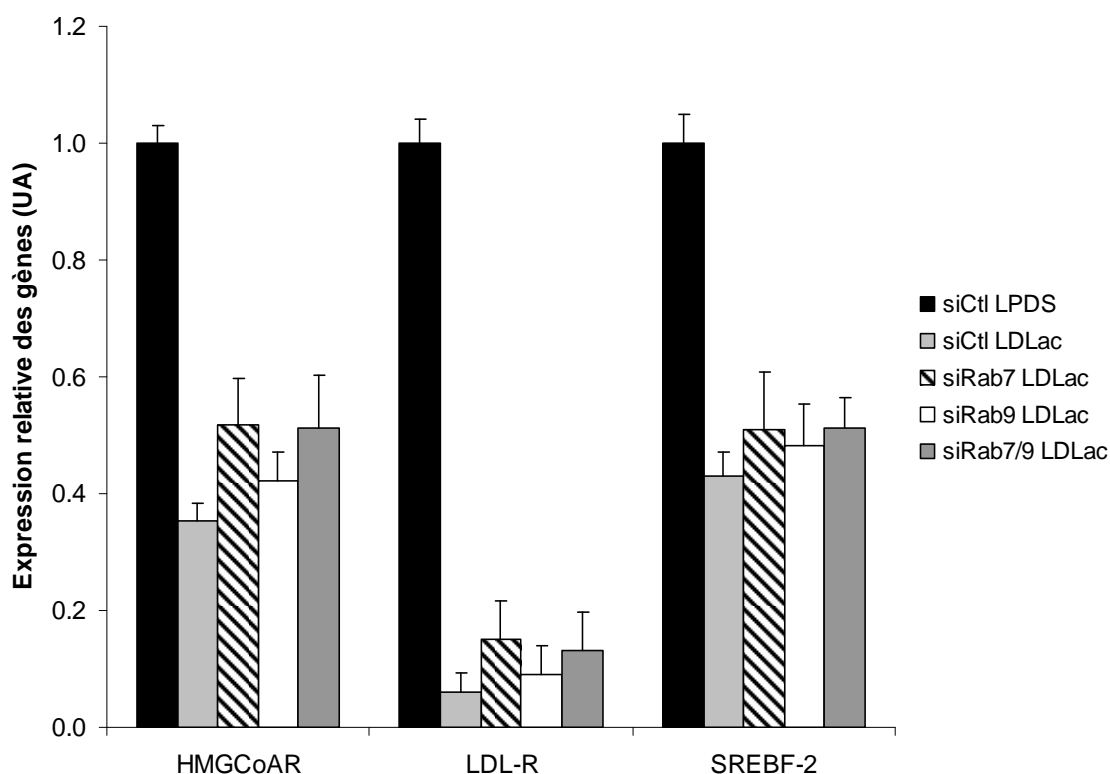


Figure 29 : Expression des gènes stérols-dépendants en fonction de l'inactivation de Rab7 et/ou Rab9 dans les HMDM

La quantification des ARNm a été réalisée par RT-PCR quantitative avec pour gène de référence UBC. Les valeurs du siCtl LPDS sont arbitrairement fixées à 1. Les variations d'expression des gènes sont rapportées à la condition siCtl LPDS après normalisation. Chaque valeur est la moyenne \pm ET de 6 expériences.

Nous avons également mesuré les quantités totales d'EC. Lorsque les cellules sont incubées avec du milieu dépourvu de lipides (LPDS, lipoprotein deficient serum), la quasi-totalité du cholestérol est présente sous forme de cholestérol libre et la proportion d'EC est faible (environ 7%) (Figure 28). En revanche, après 24 heures d'incubation avec 50 µg/ml de LDLac, la proportion d'EC augmente fortement et atteint plus de 40%. Cette quantité d'EC est réduite dans les conditions siRab7 et siRab7/9 par rapport au contrôle (-17% et -12% respectivement), mais cette variation reste moins marquée que dans les cellules HeLa.

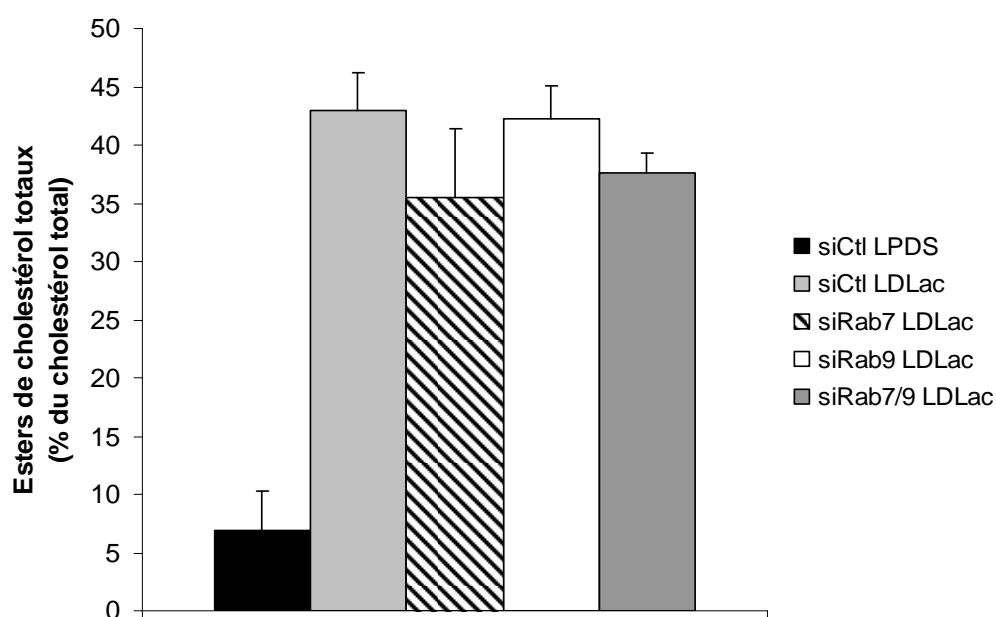


Figure 30 : Quantification des esters de cholestérol totaux en fonction de l'inactivation de Rab7 et/ou Rab9 dans les HMDM

Les esters de cholestérol sont mesurés par CLHP et sont exprimés en pourcentage de cholestérol total. Chaque valeur est la moyenne \pm ET de 3 expériences.

Nous avons ensuite apprécié le niveau d'activité de l'ACAT1 par les deux techniques spécifiques mises au point par notre équipe. Les résultats obtenus avec l'inhibiteur de l'ACAT1 révèlent qu'il n'y pas de variation significative de l'activité de l'ACAT1 dans les conditions étudiées (Figure 29 A). Avec la technique d'incubation avec le myristate, nous avons mesuré une diminution de 20% de son estérification dans les conditions siRab7 et siRab7/9 (Figure 29 B).

Les données obtenues en suivant l'expression des gènes stérols-dépendants et l'estérification du cholestérol sont concordantes et montrent que dans les macrophages l'inactivation de Rab7 seul et l'inactivation de Rab7 et Rab9 exercent un effet limité sur l'arrivée du cholestérol au niveau du RE.

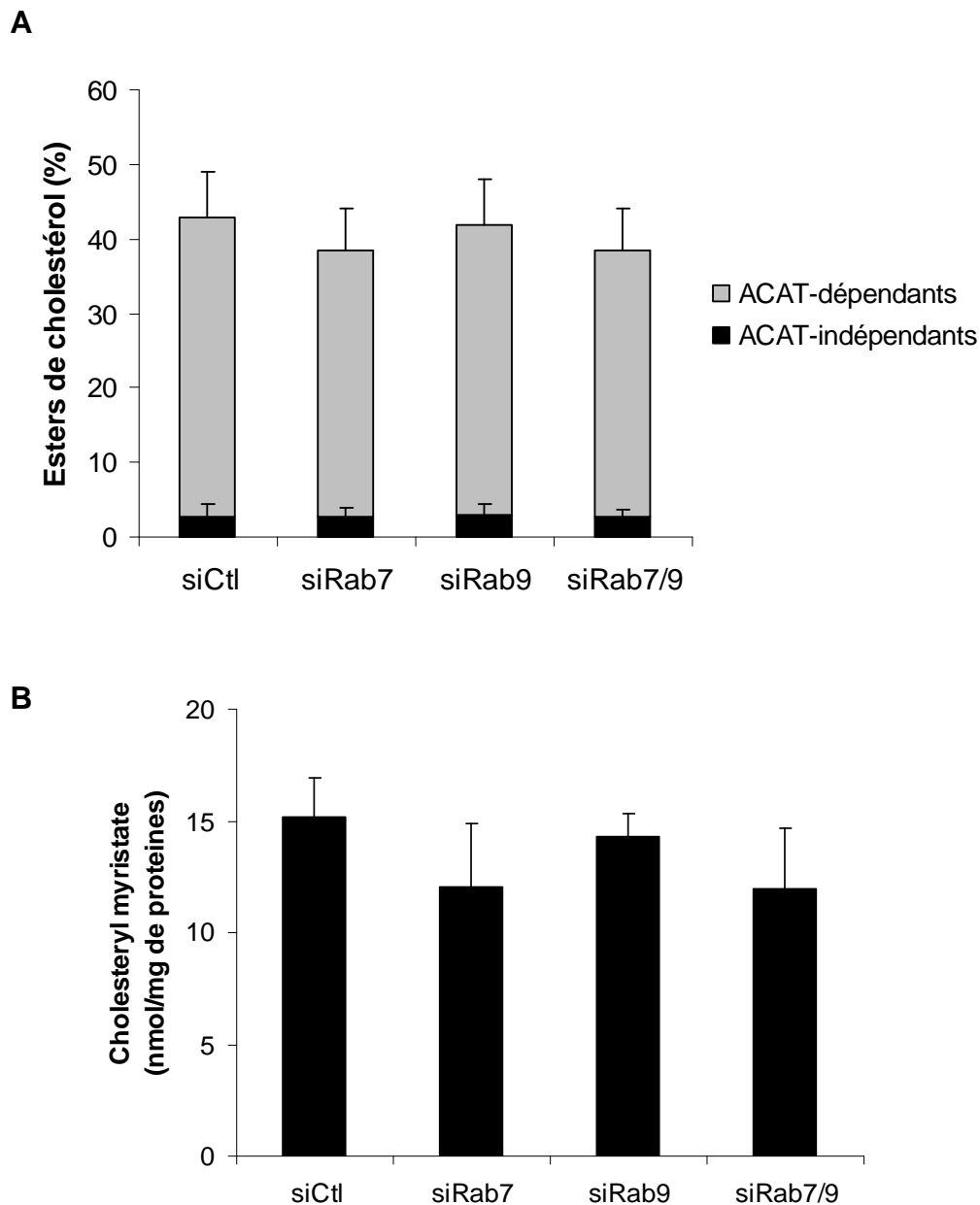


Figure 31 : Evaluation de l'activité de l'ACAT en fonction de l'inactivation de Rab7 et/ou Rab9 dans les HMDM

A. Les esters de cholestérol formés en présence ou en absence d'inhibiteur de l'ACAT (Sandoz 58-035) ont été dosés par CLHP. Ils sont exprimés en pourcentage de cholestérol total. B. Le cholesteryl myristate formé après incubation des HMDM avec 120 μ M de myristate a été mesuré par CLHP et est exprimé en nmol par mg de protéine. Chaque valeur est la moyenne \pm ET de 4 expériences.

Sachant le rôle prépondérant de l'ABCA1 dans le processus d'efflux du cholestérol, nous avons évalué l'impact du blocage du transport du cholestérol sur la capacité des HMDM à effluer le cholestérol *via* l'ABCA1. Pour cela, nous avons mesuré l'efflux en présence d'apo AI (10 µg/ml), son accepteur préférentiel. De façon surprenante, l'efflux est augmenté de 78% et 46% dans les conditions siRab7 et siRab7/9 respectivement (Figure 30). L'efflux vers l'apo AI n'est pas modifié par l'inhibition de Rab9.

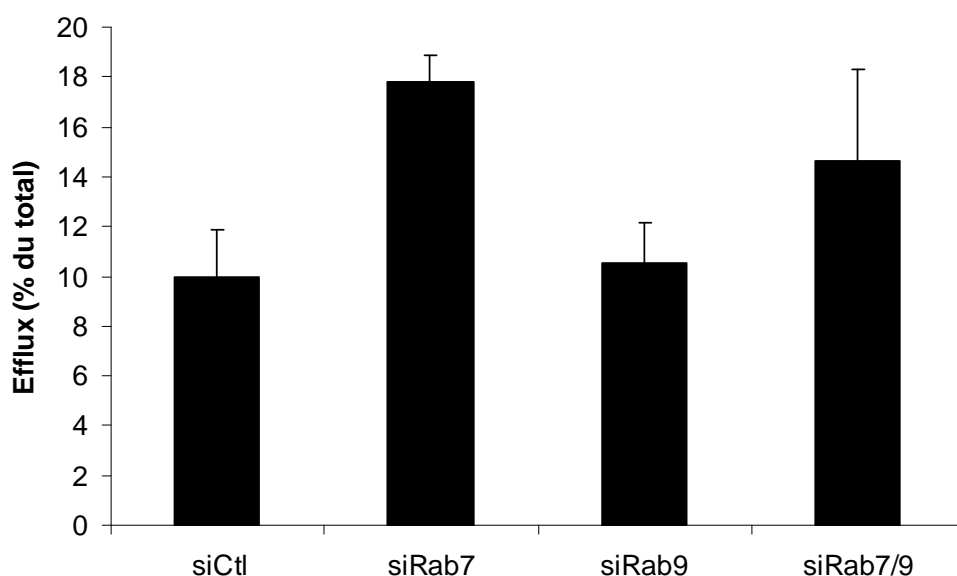


Figure 32 : Impact de l'inhibition de Rab7 et/ou Rab9 sur l'efflux ABCA1-dépendant dans les HMDM

La valeur de l'efflux dépendant de l'ABCA1 a été obtenue en présence de 10 µg/ml d'apo AI pendant 24 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'efflux total. Chaque valeur est la moyenne \pm ET de 3 expériences.

Nous avons voulu savoir si l'augmentation de l'efflux *via* l'ABCA1 est liée à une augmentation de l'expression du transporteur. Nous avons donc quantifié l'expression des ARNm de l'ABCA1. Les résultats montrent une augmentation plus importante des ARNm d'ABCA1 dans les conditions siRab7 (+51%) et siRab7/9 (+49%) par rapport à la condition siRab9 (Figure 31).

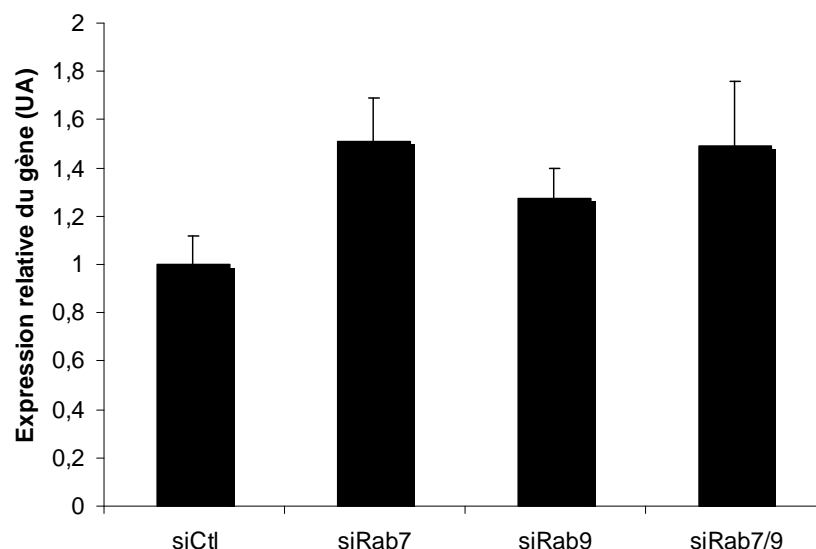


Figure 33 : Expression de l'ARNm d'ABCA1 en fonction de l'inactivation de Rab7 et/ou Rab9 dans les HMDM

La quantification des ARNm a été réalisée par RT-PCR quantitative avec pour gène de référence UBC. Les valeurs du siCtl sont arbitrairement fixées à 1. Les variations d'expression du gène ABCA1 sont rapportées à la condition siCtl après normalisation. Chaque valeur est la moyenne \pm ET de 3 expériences.

De manière concomitante, nous avons quantifié l'expression de la protéine ABCA1 par Western blot à l'aide d'un anticorps spécifiquement dirigé contre ce transporteur. L'ABCA1 est 1,7 fois plus exprimé lorsque Rab7 est inhibé (Figure 32). Une expression augmentée (x2) est aussi retrouvée dans la condition siRab7/9. En revanche, la condition siRab9 ne présente pas de variation significative de l'expression de l'ABCA1.

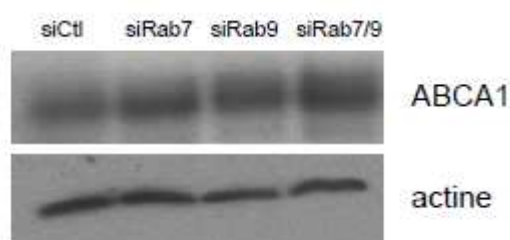


Figure 34 : Expression de la protéine ABCA1 en fonction de l'inactivation de Rab7 et/ou Rab9 dans les HMDM

Le niveau d'expression d'ABCA1 est évalué par Western blot. Le blot est représentatif de 2 expériences indépendantes.

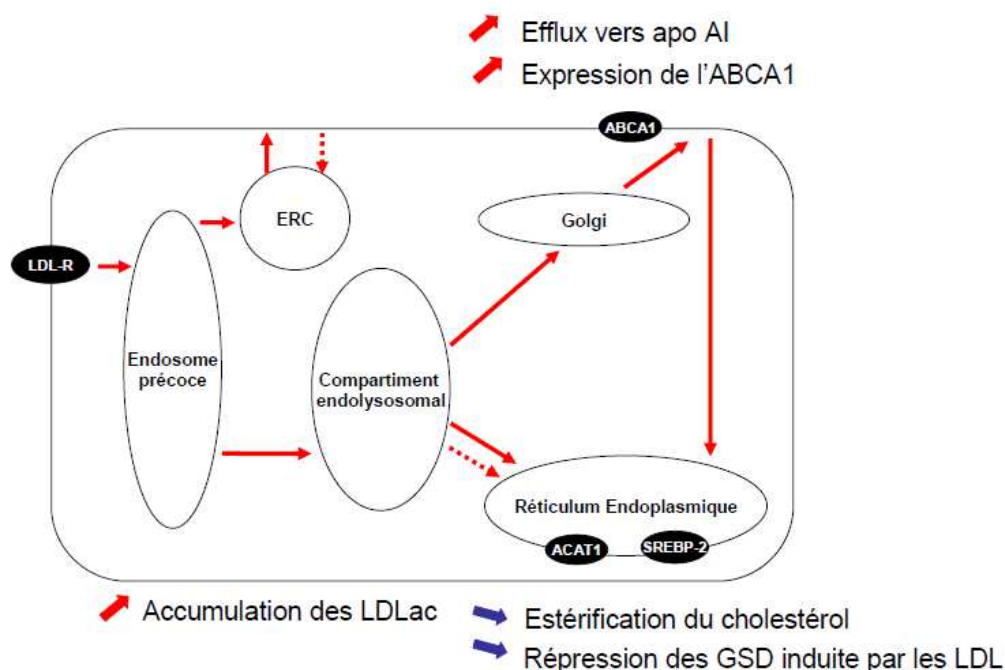


Figure 35 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'étude sur le rôle de Rab7 dans le transport du cholestérol dans les HMDM

Lorsque Rab7 est inactivée dans les HMDM, le cholestérol s'accumule dans des endosomes élargis. Malgré cette accumulation, l'arrivée du cholestérol au RE évaluée par le niveau d'expression des gènes stérols-dépendants ainsi que l'estérification du cholestérol par l'ACAT1 n'est que faiblement réduite. L'efflux du cholestérol via l'apo A1 est en revanche fortement augmenté ainsi que l'expression du transporteur ABCA1. Les flèches pleines représentent les transports vésiculaires et les flèches en pointillés les transports non vésiculaires. ABCA1, ATP binding cassette transporteur A1; ACAT1, acyl Coenzyme A:cholestérol acyl transférase 1, apo, apolipoprotéine; ERC, endosomal recycling compartment; GSD, gènes stérols-dépendants; HMDM, human monocyte-derived macrophages; LDL, low density lipoprotein; LDL-R, LDL receptor; SREBP-2, sterol regulatory element binding protein 2.

III. 2. Discussion et perspectives

Nos résultats mettent en évidence un blocage du transport des LDLac dans les HMDM lorsque Rab7 est inactivé par ARN interférence. Les répercussions sur la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau du RE sont faibles. En revanche, une augmentation significative de l'efflux médié par l'ABCA1 est observée. Ces résultats témoignent de façon frappante de la capacité des macrophages à s'adapter aux perturbations du transport du cholestérol.

Nous avons utilisé deux fois plus de siRNA dans les HMDM (50 nM) par rapport aux cellules HeLa afin d'obtenir une inhibition satisfaisante de nos protéines d'intérêt Rab7 et Rab9. Il est en effet reconnu que les cellules en culture primaire sont plus difficiles à transfecter car elles se divisent peu. Ces conditions de transfection nous ont semblé d'autant plus satisfaisantes qu'elles permettaient d'obtenir un phénotype clair d'accumulation des LDLac et du cholestérol dans les endosomes élargis. Nous avons donc validé ce protocole de transfection.

Lorsque nous avons évalué l'impact du blocage du transport du cholestérol sur l'arrivée de celui-ci au niveau du RE, nous avons été surpris d'observer des variations faibles de l'activité de l'ACAT1 (-20% d'EC dans la condition siRab7) en comparaison du phénotype net observé par immunofluorescence.

Un autre résultat étonnant concerne les proportions d'EC ACAT-indépendants. Dans les cellules HeLa, nous avons observé une augmentation de ces EC (+200%) lorsque Rab7 est inhibée. Cette augmentation correspond d'après nous à l'accumulation dans les endosomes de LDL non hydrolysées. Dans les HMDM, nous observons aussi la présence de LDLac bloquées dans les endosomes par immunofluorescence mais sans augmentation des EC ACAT-indépendants. Pour comprendre cette différence, nous avons analysé le pourcentage d'EC ACAT-dépendants et ACAT-indépendants dans les cellules HeLa et les HMDM. Dans les deux types cellulaires, la proportion d'EC totaux représente environ 40% du contenu intracellulaire en cholestérol. En revanche, les EC-ACAT indépendants représentent 25% de EC dans les cellules HeLa et seulement 10% dans les HMDM. Ces résultats indiquent donc que dans les HMDM les EC-ACAT indépendants constituent une très faible proportion des EC totaux. Cela peut en partie expliquer pourquoi dans les HMDM les variations des EC-ACAT indépendants sont peu significatives.

De manière plus générale, pour expliquer la disparité entre les effets sur le phénotype et la quantification de l'arrivée du cholestérol au RE dans les HMDM, plusieurs propositions peuvent être envisagées :

- l'inhibition de Rab7 est suffisante pour observer un phénotype mais pas pour bloquer totalement le transport du cholestérol jusqu'au RE,
- le blocage du cholestérol déclenche dans les HMDM des mécanismes compensateurs ou alternatifs qui n'existent pas dans les cellules HeLa.

Enfin, quand nous avons quantifié l'efflux du cholestérol ABCA1-dépendant, nous avons été surpris de voir que l'inactivation de Rab7 provoquait son augmentation. En effet, le phénotype d'accumulation étant proche de celui observé dans les cellules NPC ou dans les HMDM traités avec le dynasore, il était raisonnable d'envisager que cet efflux serait réduit plutôt qu'augmenté. Cette différence majeure met en évidence un mécanisme d'altération du transport différent lorsque Rab7 est spécifiquement inhibée. Afin d'étudier les mécanismes provoquant l'augmentation de l'efflux du cholestérol lorsque Rab7 est inactivée, nous envisageons plusieurs pistes d'investigation :

- Déterminer le compartiment d'accumulation des LDLac. Nous avons montré dans les cellules HeLa que le transport des LDL est affecté plus précocement dans la voie d'endocytose lorsque Rab7 est inactivé par rapport au traitement par le dynasore qui a un effet sur la sortie du cholestérol du compartiment endolysosomal. On peut supposer que ce niveau d'intervention différent dans la voie d'endocytose puisse, au moins en partie, expliquer les résultats inverses concernant l'efflux du cholestérol médié par l'ABCA1. Pour vérifier cette hypothèse, il est indispensable d'identifier la nature des endosomes dans lesquels les LDLac sont bloquées. Pour cela, nous déterminerons par microscopie confocale la localisation des LDLac-Dil à l'équilibre après immunomarquage des compartiments précoces et tardifs avec des anticorps spécifiques. Nous étudierons aussi l'endocytose des LDLac-Dil pour confirmer le niveau de blocage de leur transport.
- Déterminer la localisation de l'ABCA1 dans les HMDM. Nous savons que l'ABCA1 doit être à la membrane plasmique pour réaliser le transfert du cholestérol à l'apo AI. Cependant, l'ABCA1 est aussi retrouvé au niveau des compartiments intracellulaires pour mobiliser le cholestérol. L'efflux repose donc sur l'équilibre dynamique entre les deux localisations du transporteur. La distribution de l'ABCA1 sera étudiée par plusieurs techniques. Nous quantifierons la proportion d'ABCA1 située à la membrane plasmique par Western blot de lysats cellulaires et membranaires, et nous déterminerons par microscopie confocale la répartition subcellulaire de l'ABCA1 dans

les HMDM après immunomarquage. Enfin, nous souhaitons suivre par vidéo-microscopie le cycle de l'ABCA1 entre la membrane et les endosomes afin évaluer le rythme de transfert du cholestérol vers le compartiment extracellulaire.

- Comprendre le mécanisme d'augmentation de l'efflux ABCA1-dépendant. Nous avons déjà établi que l'expression du transporteur est augmentée lorsque Rab7 est inactivée. Il serait intéressant de connaître la cause de cette augmentation. Nous savons que les oxystérols stimulent l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 et favorisent donc l'efflux actif du cholestérol. Il a ainsi été montré que lorsque des macrophages sont traités avec des agonistes du complexe LXR/RXR, l'expression d'ABCA1 est augmentée (Costet et al., 2000). Ces résultats montrent le lien direct entre l'efflux médié par l'ABCA1 et la présence d'oxystérols, agonistes naturels du complexe LXR/RXR. Dans notre modèle, l'efflux étant augmenté, nous émettons l'hypothèse que cette augmentation est due à la stimulation du complexe LXR/RXR par les oxystérols. Nous souhaitons donc réaliser un dosage des oxystérols dans nos différentes conditions. Ces données pourront nous indiquer d'une part, l'origine de la stimulation de l'expression de l'ABCA1 et, d'autre part, le profil d'expression des oxystérols nous permettra de définir plus finement comment les voies du métabolisme du cholestérol sont modifiées. Nous souhaitons particulièrement suivre les variations de concentration du 27-hydroxycholestérol, oxystérol majoritaire dans les macrophages, et des oxystérols produits par auto-oxydation. Sachant que le 27-hydroxycholestérol est produit dans la mitochondrie (Souidi et al., 2004), une augmentation de sa concentration témoignerait d'un transport favorisé du cholestérol vers cette organelle soit par des protéines transporteuses, soit par un contact direct entre les membranes du RE et les mitochondries (Hayashi et al., 2009).
- Déterminer si l'augmentation d'efflux est spécifique de l'efflux médié par l'ABCA1. Pour cela, il faut quantifier la sortie du cholestérol libre par les autres voies d'efflux actuellement connues : *via* l'ABCG1, *via* Cla-1 et l'efflux passif. L'efflux passif sera classiquement apprécié par incubation des cellules avec de faibles concentrations de méthyl-beta-cyclodextrine. L'ABCG1 et Cla-1 sont décrits comme pouvant céder le cholestérol libre cellulaire aux HDL. Il a toutefois été montré récemment que dans les macrophages humains, l'ABCA1 participerait aussi largement à l'efflux du cholestérol libre vers les HDL (Larrede et al., 2009). L'appréciation du rôle des transporteurs ABC et Cla-1 nécessitera donc différentes combinaisons de mesure de l'efflux vers les HDL en utilisant à la fois un anticorps bloquant spécifiquement l'activité de Cla-1 et des siRNA pour annuler l'activité de l'ABCG1. En calculant les différences d'efflux

entre les différentes conditions, nous pourrions évaluer le rôle respectif d'ABCA1, ABCG1 et Cla-1 dans l'efflux du cholestérol vers les HDL.

Par ailleurs, le cholestérol libre cédé à l'apo A1 *via* l'ABCA1 est celui présent à la membrane plasmique. Outre l'augmentation d'expression de l'ABCA1 que nous observons, nous ne pouvons éliminer l'hypothèse qu'une accélération du trafic du cholestérol libre des compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique participe aussi à la stimulation de l'efflux ABCA1-dépendant. Nous mesurerons donc, dans nos conditions expérimentales, la quantité de cholestérol libre présent à la membrane plasmique par la technique de l'oxydation du cholestérol libre membranaire par la cholestérol oxydase.

En parallèle de la détermination du mécanisme d'efflux du cholestérol, il est nécessaire de mieux comprendre l'origine du cholestérol efflué lors de l'inactivation de Rab7. Plusieurs options peuvent être envisagées : le compartiment précoce, le compartiment tardif et les gouttelettes lipidiques.

Si comme nous l'avons proposé le cholestérol est bloqué dans des structures précoces, nous pouvons imaginer que ce cholestérol puisse être pris en charge soit directement par l'ABCA1, soit par d'autres protéines transporteuses du cholestérol pour rejoindre la membrane plasmique. De la même manière, si le cholestérol est bloqué au niveau des compartiments tardifs, il peut être pris en charge par des transporteurs pour rejoindre la membrane plasmique.

Etant donné qu'en conditions physiologiques une partie importante du cholestérol efflué provient des gouttelettes lipidiques, il serait aussi intéressant de pouvoir évaluer l'effet de l'inhibition de Rab7 sur leur taille, leur localisation, leur structure, leurs interactions avec d'autres compartiments intracellulaires et éventuellement leur dynamique. Ces aspects pourront être étudiés par microscopie confocale couplée à différents marquages. Les gouttelettes lipidiques pourront être mises en évidence par le marquage avec le rouge Nil ou le Bodipy 493/503. Les protéines des gouttelettes lipidiques pourront être marquées par des anticorps spécifiques.

La découverte récente du rôle de l'autophagie dans l'hydrolyse des EC permet d'envisager de nouveaux mécanismes participant à la mobilisation du cholestérol pour l'efflux (Ouimet and Marcel, 2012). Il serait donc intéressant de voir si cette voie peut participer au mécanisme d'augmentation de l'efflux du cholestérol lorsque Rab7 est inhibé. Deux arguments nous permettent de justifier que cette hypothèse nous semble moins importante à vérifier dans l'immédiat. Nous savons que Rab7 est nécessaire à la biogénèse des lysosomes (Bucci et al., 2000) ainsi que pour l'autophagie (Gutierrez et al., 2004). L'inactivation de Rab7 empêche donc la formation des lysosomes mais aussi des

autophagosomes. Il est donc peu probable que la voie de l'autophagie joue un rôle lorsque Rab7 est inactivée. De plus, des résultats récents de notre équipe montrent que cette voie n'est pas utilisée par les HMDM.

De nombreuses données appuient l'idée que stimuler la première étape du TIC depuis les macrophages spumeux est une bonne stratégie thérapeutique pour lutter contre l'athérosclérose (Linsel-Nitschke and Tall, 2005; Masson and Yvan-Charvet, 2008). Les résultats que nous avons obtenus sont particulièrement intéressants car il est rare d'identifier des conditions qui activent l'efflux dans les macrophages. Ces résultats ouvrent donc des perspectives pour le développement de nouvelles stratégies anti-athéroscléreuses.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le transport intracellulaire du cholestérol et sa distribution au niveau des différentes membranes sont essentiels pour maintenir un gradient cellulaire de cholestérol indispensable à la régulation de l'homéostasie du cholestérol mais aussi pour assurer de nombreuses fonctions cellulaires, comme par exemple, la transduction des signaux (Steck and Lange, 2010).

L'homéostasie cellulaire du cholestérol repose sur l'équilibre entre quatre phénomènes principaux : l'entrée du cholestérol dans la cellule, sa synthèse, son stockage et son efflux. Le maintien de cet équilibre n'est possible que par une régulation fine et adaptée du transport du cholestérol permettant à ce dernier de se répartir dans les différentes organelles et la membrane plasmique. Ce transport est assuré par des voies vésiculaires et non vésiculaires qui sont encore loin d'être totalement décryptées. Notre équipe a montré que l'activité GTPasique de la dynamine était nécessaire au transport du cholestérol vers le RE (Robinet et al., 2006). Son inactivation bloque la sortie du cholestérol libre du compartiment endolysosomal, entraînant son accumulation massive dans des structures endosomales anormales et une forte dérégulation de l'expression des gènes stérols-dépendants. Ces anomalies sont identiques à celles décrites dans deux pathologies qui perturbent le transport endolysosomal du cholestérol : la maladie de NPC et le syndrome des anticorps anti-phospholipides (Kobayashi et al., 1998; Mukherjee and Maxfield, 2004).

Afin de mieux comprendre la régulation et d'identifier d'autres acteurs clés de cette étape tardive du transport, nous avons durant cette thèse approfondi deux types d'acteurs du transport intracellulaire, tous deux impliqués dans le transport vésiculaire : la dynamine et les Rab GTPases.

Dans la première partie de ma thèse, suivant une approche différente de celle utilisée initialement pour inhiber la dynamine, nous avons montré que l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la dynamine, le dynasore, nous permettait de reproduire le phénotype de blocage du cholestérol au niveau endolysosomal dans différents types cellulaires (Hela et macrophages humains). Cette étude nous a permis de valider le dynasore comme outil d'étude du transport du cholestérol et de caractériser l'impact de l'U18666A sur le transport et l'efflux du cholestérol.

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons éteint l'expression de Rab7 et Rab9 par ARN interférence dans des cellules HeLa pour caractériser leur rôle dans le transport intracellulaire du cholestérol dérivé des LDL. Nos résultats ont démontré le rôle majeur de

Rab7 dans le transport du cholestérol. Nous avons également mis en évidence pour la première fois un rôle précoce de Rab7 dans plusieurs voies de transport intracellulaire. Ces données s'intègrent dans la description de plus en plus fine de la maturation endosomale comme régulateur du transport intracellulaire.

A la suite de ces deux études, la nécessité de poursuivre la caractérisation des différents régulateurs du transport du cholestérol nous semble évidente. Nous avons principalement étudié les voies du transport vésiculaire mais le transport non vésiculaire participe également de façon importante au transport du cholestérol. Ainsi, nous voulons étendre nos recherches aux membres des deux familles des protéines transporteuses du cholestérol : les ORP et les START (Soccio and Breslow, 2004). Nous pourrions dans un premier temps analyser le profil d'expression de ces protéines pour voir quelles sont celles qui sont surexprimées en condition de surcharge en cholestérol dans nos modèles cellulaires. Dans un second temps nous étudierons leur rôle dans le transport, le métabolisme et la régulation de l'homéostasie du cholestérol. De plus, il serait intéressant d'apprécier l'importance respective des voies vésiculaires et non vésiculaires dans le transport du cholestérol.

En complément de ces perspectives, nous voulons mettre à profit notre expertise pour identifier de nouveaux régulateurs du trafic intracellulaire du cholestérol. Pour cela, nous comptons développer deux approches complémentaires.

- La première approche consistera à étudier le profil d'expression de gènes impliqués dans le transport intracellulaire dans nos modèles cellulaires (HeLa et HMDM) où le transport du cholestérol aura été perturbé par le dynasore, l'U18666A ou le siRab7. Nous pourrions aussi utiliser comme modèle cellulaire « contrôle » les fibroblastes NPC qui présentent naturellement un blocage du transport du cholestérol dans le compartiment endolysosomal. L'analyse de l'expression des gènes sera réalisée sur une plateforme micro-array Affimetrix (GeneChip® fluidics station 450 and GeneChip® scanner 3000 7G) avec des puces d'expression GeneChip® Exon 1.0 ST assay. La confirmation des variations observées sera réalisée par RT-PCR quantitative.
- La seconde approche consistera à sélectionner des candidats issus d'un crible à haut débit d'une collection de plus de 1000 ARN interférents ciblant l'ensemble des kinases, GTPases et kinésines du génome. Ce travail, effectué par le Département de Transfert de l'Institut Curie, permettra de cribler l'effet des siRNA sur le transport du cholestérol intracellulaire grâce à l'utilisation d'un microscope automatisé (technologie InCell1000 system Analyser/GE Health Care®). Les algorithmes devraient reconnaître sans problème, les endosomes gorgés de LDL fluorescentes.

Nous identifierons alors deux types de régulateurs : ceux qui rétablissent des endosomes de taille normale dans les cellules traitées par le dynasore, l'U18666A ou le siRab7 et ceux qui provoquent l'accumulation endosomale de cholestérol dans des cellules « normales ». Les « hits » identifiés grâce à ce crible seront validés au laboratoire par les techniques de microscopie, de RT-PCR quantitative et de CLHP.

Dans la dernière partie de ma thèse, nous avons étudié l'impact de l'inactivation de Rab7 et Rab9 dans un modèle cellulaire de macrophages humains, les HMDM. Nous avons montré que malgré l'accumulation de LDLac dans les endosomes, la régulation de l'homéostasie du cholestérol n'était que modérément perturbée. Cela peut être expliqué par une plus grande capacité de ces cellules à rediriger le cholestérol notamment en l'effluant. Nous avons en effet observé une forte augmentation de l'efflux médié par l'ABCA1 lorsque Rab7 est inactivé. Grâce à cette étude, nous avons mis en évidence un rôle de Rab7 dans l'efflux du cholestérol des macrophages.

Nos perspectives immédiates s'orientent vers la recherche des mécanismes à l'origine de cette augmentation d'efflux mais nous souhaiterions également prolonger nos travaux en étudiant l'impact *in vivo* de l'inhibition de Rab7 sur des modèles animaux.

Tout d'abord, il nous faudra valider notre observation dans des cellules du modèle animal choisi. Nous envisageons d'utiliser comme modèle animal la Souris. Certes, le modèle murin n'est pas le meilleur modèle animal pour l'étude de l'athérosclérose puisque naturellement les souris ne sont pas sujettes à cette pathologie. Il existe toutefois des souris KO pour le gène LDL-R et le gène apo E couramment utilisées car elles présentent une forte hypercholestérolémie qui provoque la formation de plaques d'athérosclérose. A notre connaissance, il n'existe pas de lignée de souris KO pour Rab7. Effectivement, nous avons trouvé des données indiquant que la mutation des Rab7 est létale à l'état homozygote chez l'embryon (Kawamura et al., 2012). Pour obtenir une souris KO pour Rab7, il faut donc envisager de créer un système d'expression conditionnelle du gène dans le temps ou dans l'espace. Nous aimerions limiter l'inhibition de Rab7 aux macrophages car nous craignons que l'inactivation de Rab7 ait des effets délétères sur le système nerveux comme observé dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth type 2B.

Une fois obtenues nos souris KO pour Rab7, nous pourrions les croiser avec des souris « athéroscléreuses » ou des souris saines afin de quantifier l'effet de l'inactivation de Rab7 sur la survenue de complications cardiovasculaires et la durée de vie des souris. Si les souris vivent plus longtemps cela pourrait être la preuve de concept que l'inactivation ciblée de Rab7 aux macrophages est un traitement contre l'athérosclérose.

Nos résultats seront à rapprocher à la seule étude à notre connaissance ayant montré un lien *in vivo* entre Rab7 et l'athérosclérose. Kim et coll. ont mis en évidence une expression

plus importante de Rab7 dans les plaques d'athérosclérose de patients et plus particulièrement dans les régions riches en macrophages (Kim et al., 2002). Les auteurs ne proposent pas d'explication à cette surexpression et ne déterminent pas si elle est une cause de l'accumulation du cholestérol dans les cellules ou si c'est au contraire un moyen de défense des macrophages pour tenter de réduire l'accumulation du cholestérol, comme nous l'avons montré.

Par ailleurs, il serait intéressant de développer un système d'inhibition de Rab7 utilisable dans un but thérapeutique. Deux pistes de développement sont envisageables : les siRNA et les inhibiteurs pharmacologiques. Encore une fois ces agents modulateurs de l'expression de Rab7 devront être couplés à un système de vectorisation pour cibler spécifiquement les macrophages.

Les siRNA ont déjà été utilisés dans des essais cliniques chez l'Homme (Bevasiranib dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge) mais sont pour le moment plutôt utilisés dans le cadre d'administrations locales. L'avantage des siRNA est qu'ils ont une action très spécifique.

Concernant les inhibiteurs pharmacologiques, le problème rencontré est celui de la spécificité d'inhibition due à la forte homologie entre les protéines Rab. Bien qu'il n'existe pas encore d'inhibiteurs spécifiques des Rab, on peut signaler le développement d'inhibiteurs des GGTases (Deraeve et al., 2012). Au cours d'un criblage ayant pour but d'identifier des inhibiteurs des Rab, le CID1067700, un pan-inhibiteur de Rab, a été identifié. Il exerce une inhibition particulièrement forte pour Rab7 (Agola et al., 2012). Une alternative à ces inhibiteurs serait de cibler les effecteurs des Rab qui sont spécifiques.

Les résultats obtenus dans la troisième partie de la thèse illustrent les applications possibles de notre étude sur le rôle de Rab7 vers des aspects plus appliqués comme la modulation de l'activité des Rab pour traiter les pathologies humaines.

La maladie de Charcot-Marie-Tooth type 2B est une neuropathie périphérique causée par plusieurs mutations gain de fonction de Rab7. Le développement d'un traitement se heurte pour le moment à l'absence de connaissance sur le mécanisme physiopathologique de la maladie (Bucci and De Luca, 2012).

On peut noter qu'il a également été montré que Rab7 est plus exprimé dans les zones du cerveau les plus touchées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Ginsberg et al., 2010). Dans ces deux pathologies, la diminution de l'activation de Rab7 pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante.

Il existe toutefois d'autres pathologies, dont la maladie de NPC, dans lesquelles le principe sera au contraire d'augmenter ou de potentialiser l'action des Rab. Les équipes qui ont surexprimé Rab4, Rab7, Rab8 ou Rab9 dans les modèles cellulaires et Rab9 dans les modèles de souris transgéniques (Choudhury et al., 2002; Kaptzan et al., 2009) ont démontré l'intérêt d'augmenter la quantité de Rab pour rétablir le transport du cholestérol.

Pour conclure, sachant le rôle central du transport intracellulaire dans la signalisation et le métabolisme cellulaires, nos données pourront permettre de mieux comprendre à la fois les mécanismes de régulation physiologiques et certains phénomènes pathologiques. De plus en plus de données indiquent que les Rab sont dérégulées dans de nombreux cancers (Recchi and Seabra, 2012). Ces dérégulations favorisent plusieurs aspects de la progression tumorale : migration cellulaire, invasion et prolifération cellulaire. On peut noter par exemple les travaux de l'équipe d'A.L. Edinger qui montrent le rôle de Rab7 dans le contrôle de la croissance cellulaire et les phénomènes de résistance à l'apoptose (Peralta et al., 2010; Romero Rosales et al., 2009). Ces données soulignent l'intérêt de la modulation des Rab comme approche thérapeutique anticancéreuse.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, C.M., J. Reitz, J.K. De Brabander, J.D. Feramisco, L. Li, M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 2004. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem.* 279:52772-52780.
- Agola, J.O., L. Hong, Z. Surviladze, O. Ursu, A. Waller, J.J. Strouse, D.S. Simpson, C.E. Schroeder, T.I. Oprea, J.E. Golden, J. Aube, T. Buranda, L.A. Sklar, and A. Wandinger-Ness. 2012. A competitive nucleotide binding inhibitor: in vitro characterization of Rab7 GTPase inhibition. *ACS chemical biology.* 7:1095-1108.
- Alpy, F., and C. Tomasetto. 2005. Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J Cell Sci.* 118:2791-2801.
- Arighi, C.N., L.M. Hartnell, R.C. Aguilar, C.R. Haft, and J.S. Bonifacino. 2004. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol.* 165:123-133.
- Baranowski, M. 2008. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol.* 59 Suppl 7:31-55.
- Barbero, P., L. Bittova, and S.R. Pfeffer. 2002. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol.* 156:511-518.
- Bayer, N., D. Schober, E. Prchla, R.F. Murphy, D. Blaas, and R. Fuchs. 1998. Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *Journal of virology.* 72:9645-9655.
- Benmerah, A., and C. Lamaze. 2002. [Endocytose : chaque voie compte !]. *Medecine sciences : M/S:*1126_1136.
- Blom, T., P. Somerharju, and E. Ikonen. 2011. Synthesis and biosynthetic trafficking of membrane lipids. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 3:a004713.
- Bonifacino, J.S., and J.H. Hurley. 2008. Retromer. *Curr Opin Cell Biol.* 20:427-436.
- Bonifacino, J.S., and R. Rojas. 2006. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:568-579.
- Borthwick, F., A.M. Allen, J.M. Taylor, and A. Graham. 2010. Overexpression of STARD3 in human monocyte/macrophages induces an anti-atherogenic lipid phenotype. *Clin Sci (Lond).* 119:265-272.
- Brown, M.S., and J.L. Goldstein. 1979. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:3330-3337.
- Brown, M.S., and J.L. Goldstein. 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11041-11048.
- Brown, M.S., Y.K. Ho, and J.L. Goldstein. 1980. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem.* 255:9344-9352.
- Bucci, C., and M. De Luca. 2012. Molecular basis of Charcot-Marie-Tooth type 2B disease. *Biochem Soc Trans.* 40:1368-1372.
- Bucci, C., P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy, and B. van Deurs. 2000. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell.* 11:467-480.
- Burd, C.G. 2011. Physiology and pathology of endosome-to-Golgi retrograde sorting. *Traffic.* 12:948-955.
- Cai, H., K. Reinisch, and S. Ferro-Novick. 2007. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell.* 12:671-682.
- Cantalupo, G., P. Alifano, V. Roberti, C.B. Bruni, and C. Bucci. 2001. Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J.* 20:683-693.
- Carroll, K.S., J. Hanna, I. Simon, J. Krise, P. Barbero, and S.R. Pfeffer. 2001. Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science.* 292:1373-1376.

- Carstea, E.D., J.A. Morris, K.G. Coleman, S.K. Loftus, D. Zhang, C. Cummings, J. Gu, M.A. Rosenfeld, W.J. Pavan, D.B. Krizman, J. Nagle, M.H. Polymeropoulos, S.L. Sturley, Y.A. Ioannou, M.E. Higgins, M. Comly, A. Cooney, A. Brown, C.R. Kaneski, E.J. Blanchette-Mackie, N.K. Dwyer, E.B. Neufeld, T.Y. Chang, L. Liscum, J.F. Strauss, 3rd, K. Ohno, M. Zeigler, R. Carmi, J. Sokol, D. Markie, R.R. O'Neill, O.P. van Diggelen, M. Elleder, M.C. Patterson, R.O. Brady, M.T. Vanier, P.G. Pentchev, and D.A. Tagle. 1997. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*. 277:228-231.
- Cenedella, R.J. 2009. Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids*. 44:477-487.
- Ceresa, B.P. 2006. Regulation of EGFR endocytic trafficking by rab proteins. *Histol Histopathol*. 21:987-993.
- Ceresa, B.P., and S.J. Bahr. 2006. rab7 activity affects epidermal growth factor:epidermal growth factor receptor degradation by regulating endocytic trafficking from the late endosome. *J Biol Chem*. 281:1099-1106.
- Chang, T.Y., C.C. Chang, S. Lin, C. Yu, B.L. Li, and A. Miyazaki. 2001. Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr Opin Lipidol*. 12:289-296.
- Chang, T.Y., C.C. Chang, N. Ohgami, and Y. Yamauchi. 2006. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annual review of cell and developmental biology*. 22:129-157.
- Charman, M., B.E. Kennedy, N. Osborne, and B. Karten. 2010. MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick Type C1 protein. *J Lipid Res*. 51:1023-1034.
- Chavrier, P., R.G. Parton, H.P. Hauri, K. Simons, and M. Zerial. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*. 62:317-329.
- Chen, W., N. Wang, and A.R. Tall. 2005. A PEST deletion mutant of ABCA1 shows impaired internalization and defective cholesterol efflux from late endosomes. *J Biol Chem*. 280:29277-29281.
- Chinetti-Gbaguidi, G., and B. Staels. 2009. Lipid ligand-activated transcription factors regulating lipid storage and release in human macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1791:486-493.
- Chinetti, G., S. Lestavel, V. Bocher, A.T. Remaley, B. Neve, I.P. Torra, E. Teissier, A. Minnich, M. Jaye, N. Duverger, H.B. Brewer, J.C. Fruchart, V. Clavey, and B. Staels. 2001. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med*. 7:53-58.
- Choudhury, A., M. Dominguez, V. Puri, D.K. Sharma, K. Narita, C.L. Wheatley, D.L. Marks, and R.E. Pagano. 2002. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J Clin Invest*. 109:1541-1550.
- Choudhury, A., D.K. Sharma, D.L. Marks, and R.E. Pagano. 2004. Elevated endosomal cholesterol levels in Niemann-Pick cells inhibit rab4 and perturb membrane recycling. *Mol Biol Cell*. 15:4500-4511.
- Corbeel, L., and K. Freson. 2008. Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur J Pediatr*. 167:723-729.
- Costet, P., Y. Luo, N. Wang, and A.R. Tall. 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem*. 275:28240-28245.
- Cuchel, M., and D.J. Rader. 2006. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*. 113:2548-2555.
- Darchen, F., and B. Goud. 2000. Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie*. 82:375-384.

- de La Llera-Moya, M., M.A. Connelly, D. Drazul, S.M. Klein, E. Favari, P.G. Yancey, D.L. Williams, and G.H. Rothblat. 2001. Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *J Lipid Res.* 42:1969-1978.
- de Winther, M.P., and M.H. Hofker. 2000. Scavenging new insights into atherogenesis. *J Clin Invest.* 105:1039-1041.
- Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 42:1007-1017.
- Deinhardt, K., S. Salinas, C. Verastegui, R. Watson, D. Worth, S. Hanrahan, C. Bucci, and G. Schiavo. 2006. Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron.* 52:293-305.
- Del Conte-Zerial, P., L. Bruschi, J.C. Rink, C. Collinet, Y. Kalaidzidis, M. Zerial, and A. Deutsch. 2008. Membrane identity and GTPase cascades regulated by toggle and cut-out switches. *Mol Syst Biol.* 4:206.
- Deraeve, C., Z. Guo, R.S. Bon, W. Blankenfeldt, R. DiLucrezia, A. Wolf, S. Menninger, E.A. Stigter, S. Wetzel, A. Choidas, K. Alexandrov, H. Waldmann, R.S. Goody, and Y.W. Wu. 2012. Psoromic acid is a selective and covalent Rab-prenylation inhibitor targeting autoinhibited RabGGTase. *Journal of the American Chemical Society.* 134:7384-7391.
- Dhaliwal, B.S., and U.P. Steinbrecher. 1999. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta.* 286:191-205.
- Diaz, E., F. Schimmoller, and S.R. Pfeffer. 1997. A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport. *J Cell Biol.* 138:283-290.
- Dietschy, J.M., S.D. Turley, and D.K. Spady. 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res.* 34:1637-1659.
- Doherty, G.J., and H.T. McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 78:857-902.
- Du, X., A.S. Kazim, A.J. Brown, and H. Yang. 2012. An essential role of Hrs/Vps27 in endosomal cholesterol trafficking. *Cell Rep.* 1:29-35.
- Duffy, D., and D.J. Rader. 2009. Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol.* 6:455-463.
- Fajas, L., J.C. Fruchart, and J. Auwerx. 1998. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS letters.* 438:55-60.
- Ferguson, S.M., and P. De Camilli. 2012. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:75-88.
- Fielding, C.J., and P.E. Fielding. 2001. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Advanced drug delivery reviews.* 49:251-264.
- Frolov, A., S.E. Zielinski, J.R. Crowley, N. Dudley-Rucker, J.E. Schaffer, and D.S. Ory. 2003. NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. *J Biol Chem.* 278:25517-25525.
- Ganley, I.G., E. Espinosa, and S.R. Pfeffer. 2008. A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *J Cell Biol.* 180:159-172.
- Ganley, I.G., and S.R. Pfeffer. 2006. Cholesterol accumulation sequesters Rab9 and disrupts late endosome function in NPC1-deficient cells. *J Biol Chem.* 281:17890-17899.
- Garver, W.S., D. Jelinek, G.A. Francis, and B.D. Murphy. 2008. The Niemann-Pick C1 gene is downregulated by feedback inhibition of the SREBP pathway in human fibroblasts. *J Lipid Res.*
- Ginsberg, S.D., E.J. Mufson, S.E. Counts, J. Wu, M.J. Alldred, R.A. Nixon, and S. Che. 2010. Regional selectivity of rab5 and rab7 protein upregulation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD.* 22:631-639.

- Goldstein, J.L., and M.S. Brown. 1984. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res.* 25:1450-1461.
- Gonnord, P., C.M. Blouin, and C. Lamaze. 2012. Membrane trafficking and signaling: two sides of the same coin. *Semin Cell Dev Biol.* 23:154-164.
- Gorvel, J.P., P. Chavrier, M. Zerial, and J. Gruenberg. 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell.* 64:915-925.
- Grosshans, B.L., D. Ortiz, and P. Novick. 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11821-11827.
- Gruenberg, J., and H. Stenmark. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:317-323.
- Gurkan, C., H. Lapp, C. Alory, A.I. Su, J.B. Hogenesch, and W.E. Balch. 2005. Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: the membrome. *Mol Biol Cell.* 16:3847-3864.
- Gutierrez, M.G., D.B. Munafo, W. Beron, and M.I. Colombo. 2004. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci.* 117:2687-2697.
- Haas, A., D. Scheglmann, T. Lazar, D. Gallwitz, and W. Wickner. 1995. The GTPase Ypt7p of *Saccharomyces cerevisiae* is required on both partner vacuoles for the homotypic fusion step of vacuole inheritance. *EMBO J.* 14:5258-5270.
- Hayashi, T., R. Rizzuto, G. Hajnoczky, and T.P. Su. 2009. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* 19:81-88.
- Heino, S., S. Lusa, P. Somerharju, C. Ehnholm, V.M. Olkkonen, and E. Ikonen. 2000. Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:8375-8380.
- Hinshaw, J.E. 2006. Filling the GAP for dynamin. *Nat Cell Biol.* 8:432-433.
- Hirano, Y., M. Yoshida, M. Shimizu, and R. Sato. 2001. Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 276:36431-36437.
- Holtta-Vuori, M., F. Alpy, K. Tanhuanpaa, E. Jokitalo, A.L. Mutka, and E. Ikonen. 2005. MLN64 is involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles. *Mol Biol Cell.* 16:3873-3886.
- Holtta-Vuori, M., K. Tanhuanpaa, W. Mobius, P. Somerharju, and E. Ikonen. 2002. Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol Biol Cell.* 13:3107-3122.
- Horiuchi, H., R. Lippe, H.M. McBride, M. Rubino, P. Woodman, H. Stenmark, V. Rybin, M. Wilm, K. Ashman, M. Mann, and M. Zerial. 1997. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell.* 90:1149-1159.
- Horton, J.D. 2002. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans.* 30:1091-1095.
- Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 109:1125-1131.
- Hussain, M.M., D.K. Strickland, and A. Bakillah. 1999. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr.* 19:141-172.
- Igarashi, M., J. Osuga, H. Uozaki, M. Sekiya, S. Nagashima, M. Takahashi, S. Takase, M. Takanashi, Y. Li, K. Ohta, M. Kumagai, M. Nishi, M. Hosokawa, C. Fledelius, P. Jacobsen, H. Yagyu, M. Fukayama, R. Nagai, T. Kadowaki, K. Ohashi, and S. Ishibashi. 2010. The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages. *Circ Res.* 107:1387-1395.
- Ikonen, E. 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:125-138.
- Itin, C., C. Rancano, Y. Nakajima, and S.R. Pfeffer. 1997. A novel assay reveals a role for soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein in mannose 6-

- phosphate receptor transport from endosomes to the trans Golgi network. *J Biol Chem.* 272:27737-27744.
- Jager, S., C. Bucci, I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami, P. Saftig, and E.L. Eskelinen. 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* 117:4837-4848.
- Jahn, R., and H. Grubmüller. 2002. Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol.* 14:488-495.
- Jahn, R., and R.H. Scheller. 2006. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:631-643.
- Jeon, T.I., and T.F. Osborne. 2012. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 23:65-72.
- Johannes, L., and V. Popoff. 2008. Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell.* 135:1175-1187.
- Johansson, M., N. Rocha, W. Zwart, I. Jordens, L. Janssen, C. Kuijl, V.M. Olkkonen, and J. Neefjes. 2007. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betalll spectrin. *J Cell Biol.* 176:459-471.
- Jones, N.L., and M.C. Willingham. 1999. Modified LDLs are internalized by macrophages in part via macropinocytosis. *Anat Rec.* 255:57-68.
- Jordens, I., M. Fernandez-Borja, M. Marsman, S. Dusseljee, L. Janssen, J. Calafat, H. Janssen, R. Wubbolts, and J. Neefjes. 2001. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Current biology : CB.* 11:1680-1685.
- Kaplan, M.R., and R.D. Simoni. 1985. Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 101:446-453.
- Kaptzan, T., S.A. West, E.L. Holicky, C.L. Wheatley, D.L. Marks, T. Wang, K.B. Peake, J. Vance, S.U. Walkley, and R.E. Pagano. 2009. Development of a Rab9 transgenic mouse and its ability to increase the lifespan of a murine model of Niemann-Pick type C disease. *Am J Pathol.* 174:14-20.
- Kawamura, N., G.H. Sun-Wada, M. Aoyama, A. Harada, S. Takasuga, T. Sasaki, and Y. Wada. 2012. Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nature communications.* 3:1071.
- Kennedy, M.A., G.C. Barrera, K. Nakamura, A. Baldan, P. Tarr, M.C. Fishbein, J. Frank, O.L. Francone, and P.A. Edwards. 2005. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 1:121-131.
- Kerr, M.C., and R.D. Teasdale. 2009. Defining macropinocytosis. *Traffic.* 10:364-371.
- Kielar, D., W. Dietmaier, T. Langmann, C. Aslanidis, M. Probst, M. Naruszewicz, and G. Schmitz. 2001. Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clinical chemistry.* 47:2089-2097.
- Kim, J.B., and B.M. Spiegelman. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 10:1096-1107.
- Kim, J.Y., M.K. Jang, S.S. Lee, M.S. Choi, S.H. Bok, G.T. Oh, and Y.B. Park. 2002. Rab7 gene is up-regulated by cholesterol-rich diet in the liver and artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:375-382.
- Kobayashi, T., M.H. Beuchat, M. Lindsay, S. Frias, R.D. Palmiter, H. Sakuraba, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 1999. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol.* 1:113-118.
- Kobayashi, T., E. Stang, K.S. Fang, P. de Moerloose, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature.* 392:193-197.
- Kornfeld, S. 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem.* 61:307-330.
- Krahmer, N., Y. Guo, R.V. Farese, Jr., and T.C. Walther. 2009. SnapShot: Lipid Droplets. *Cell.* 139:1024-1024 e1021.
- Kruth, H.S., N.L. Jones, W. Huang, B. Zhao, I. Ishii, J. Chang, C.A. Combs, D. Malide, and W.Y. Zhang. 2005. Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates

- macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 280:2352-2360.
- Kwon, H.J., L. Abi-Mosleh, M.L. Wang, J. Deisenhofer, J.L. Goldstein, M.S. Brown, and R.E. Infante. 2009. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell.* 137:1213-1224.
- Lagrot, L., D. Masson, and J. Chapman. 2005. Lipoprotéines et métabolisme lipidique. *Société Française d'Athérosclérose, article 1069.*
- Lalloyer, F., and B. Staels. 2010. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:894-899.
- Lange, Y. 1992. Tracking cell cholesterol with cholesterol oxidase. *J Lipid Res.* 33:315-321.
- Lange, Y., J. Ye, M. Rigney, and T.L. Steck. 1999. Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res.* 40:2264-2270.
- Lapointe, J., T.Q. Truong, L. Falstraalt, and L. Brissette. 2006. Differential abilities of mouse liver parenchymal and nonparenchymal cells in HDL and LDL (native and oxidized) association and cholesterol efflux. *Biochem Cell Biol.* 84:250-256.
- Larrede, S., C.M. Quinn, W. Jessup, E. Frisdal, M. Olivier, V. Hsieh, M.J. Kim, M. Van Eck, P. Couvert, A. Carrie, P. Giral, M.J. Chapman, M. Guerin, and W. Le Goff. 2009. Stimulation of Cholesterol Efflux by LXR Agonists in Cholesterol-Loaded Human Macrophages Is ABCA1-Dependent but ABCG1-Independent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:1930-1936.
- Lebrand, C., M. Corti, H. Goodson, P. Cosson, V. Cavalli, N. Mayran, J. Faure, and J. Gruenberg. 2002. Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *Embo J.* 21:1289-1300.
- Lehto, M., S. Laitinen, G. Chinetti, M. Johansson, C. Ehnholm, B. Staels, E. Ikonen, and V.M. Olkkonen. 2001. The OSBP-related protein family in humans. *J Lipid Res.* 42:1203-1213.
- Leventhal, A.R., C.C. Leslie, and I. Tabas. 2004. Suppression of macrophage eicosanoid synthesis by atherogenic lipoproteins is profoundly affected by cholesterol-fatty acyl esterification and the Niemann-Pick C pathway of lipid trafficking. *J Biol Chem.* 279:8084-8092.
- Li, A.C., and C.K. Glass. 2002. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med.* 8:1235-1242.
- Libby, P., M. Aikawa, and U. Schonbeck. 2000. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1529:299-309.
- Linder, M.D., R.L. Uronen, M. Holtta-Vuori, P. van der Sluijs, J. Peranen, and E. Ikonen. 2007. Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol Biol Cell.* 18:47-56.
- Lingwood, D., and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 327:46-50.
- Linsel-Nitschke, P., and A.R. Tall. 2005. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature reviews. Drug discovery.* 4:193-205.
- Lippe, R., M. Miaczynska, V. Rybin, A. Runge, and M. Zerial. 2001. Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol Biol Cell.* 12:2219-2228.
- Liscum, L., and J.R. Faust. 1989. The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem.* 264:11796-11806.
- Liscum, L., and N.J. Munn. 1999. Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.* 1438:19-37.
- Lombardi, D., T. Soldati, M.A. Riederer, Y. Goda, M. Zerial, and S.R. Pfeffer. 1993. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *Embo J.* 12:677-682.
- Lorkowski, S., M. Kratz, C. Wenner, R. Schmidt, B. Weitkamp, M. Fobker, J. Reinhardt, J. Rauterberg, E.A. Galinski, and P. Cullen. 2001. Expression of the ATP-binding

- cassette transporter gene ABCG1 (ABC8) in Tangier disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 283:821-830.
- Luzio, J.P., P.R. Pryor, and N.A. Bright. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:622-632.
- Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner, and T. Kirchhausen. 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell.* 10:839-850.
- Mahley, R.W., K.H. Weisgraber, T.L. Innerarity, and S.C. Rall, Jr. 1991. Genetic defects in lipoprotein metabolism. Elevation of atherogenic lipoproteins caused by impaired catabolism. *JAMA.* 265:78-83.
- Mallard, F., C. Antony, D. Tenza, J. Salamero, B. Goud, and L. Johannes. 1998. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol.* 143:973-990.
- Mallard, F., B.L. Tang, T. Galli, D. Tenza, A. Saint-Pol, X. Yue, C. Antony, W. Hong, B. Goud, and L. Johannes. 2002. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol.* 156:653-664.
- Marsh, M., and H.T. McMahon. 1999. The structural era of endocytosis. *Science.* 285:215-220.
- Martin, S., K. Driessen, S.J. Nixon, M. Zerial, and R.G. Parton. 2005. Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J Biol Chem.* 280:42325-42335.
- Masson, D., and L. Yvan-Charvet. 2008. [Raising HDL-cholesterol: the future drug therapy for atherosclerosis?]. *Medecine sciences : M/S.* 24:341-343.
- Maxfield, F.R., and G. van Meer. 2010. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol.* 22:422-429.
- Maxfield, F.R., and D. Wustner. 2002. Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest.* 110:891-898.
- McCray, B.A., E. Skordalakes, and J.P. Taylor. 2010. Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Hum Mol Genet.* 19:1033-1047.
- McMahon, H.T., and E. Boucrot. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:517-533.
- McPherson, R., and A. Gauthier. 2004. Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. *Biochem Cell Biol.* 82:201-211.
- Mellman, I., R. Fuchs, and A. Helenius. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem.* 55:663-700.
- Meresse, S., J.P. Gorvel, and P. Chavrier. 1995. The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci.* 108 (Pt 11):3349-3358.
- Mesaki, K., K. Tanabe, M. Obayashi, N. Oe, and K. Takei. 2011. Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS One.* 6:e19764.
- Mesmin, B., and F.R. Maxfield. 2009. Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 1791:636-645.
- Miller, W.L. 2007. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta.* 1771:663-676.
- Miller, Y.I., S.H. Choi, L. Fang, and R. Harkewicz. 2009. Toll-like receptor-4 and lipoprotein accumulation in macrophages. *Trends Cardiovasc Med.* 19:227-232.
- Mitra, S., K.W. Cheng, and G.B. Mills. 2011. Rab GTPases implicated in inherited and acquired disorders. *Semin Cell Dev Biol.* 22:57-68.
- Mohrmann, K., and P. van der Sluijs. 1999. Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases. *Mol Membr Biol.* 16:81-87.
- Moore, K.J., and M.W. Freeman. 2006. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1702-1711.
- Moore, K.J., and I. Tabas. 2011. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 145:341-355.

- Morozova, S., I. Suc-Royer, and J. Auwerx. 2005. [Cholesterol metabolism modulators in future drug therapy for atherosclerosis]. *Medecine sciences : M/S*. 21 Spec No:53-58.
- Mukherjee, S., and F.R. Maxfield. 2004. Lipid and cholesterol trafficking in NPC. *Biochim Biophys Acta*. 1685:28-37.
- Narita, K., A. Choudhury, K. Dobrenis, D.K. Sharma, E.L. Holicky, D.L. Marks, S.U. Walkley, and R.E. Pagano. 2005. Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage. *Faseb J*. 19:1558-1560.
- Nassoy, P., and C. Lamaze. 2012. Stressing caveolae new role in cell mechanics. *Trends Cell Biol*. 22:381-389.
- Neufeld, E.B., A.M. Cooney, J. Pitha, E.A. Dawidowicz, N.K. Dwyer, P.G. Pentchev, and E.J. Blanchette-Mackie. 1996. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem*. 271:21604-21613.
- Neufeld, E.B., J.A. Stonik, S.J. Demosky, Jr., C.L. Knapper, C.A. Combs, A. Cooney, M. Comly, N. Dwyer, J. Blanchette-Mackie, A.T. Remaley, S. Santamarina-Fojo, and H.B. Brewer, Jr. 2004. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J Biol Chem*. 279:15571-15578.
- Nickerson, D.P., C.L. Brett, and A.J. Merz. 2009. Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Curr Opin Cell Biol*. 21:543-551.
- Nicoziani, P., F. Vilhardt, A. Llorente, L. Hilout, P.J. Courtoy, K. Sandvig, and B. van Deurs. 2000. Role for dynamin in late endosome dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Mol Biol Cell*. 11:481-495.
- Okazaki, H., M. Igarashi, M. Nishi, M. Sekiya, M. Tajima, S. Takase, M. Takanashi, K. Ohta, Y. Tamura, S. Okazaki, N. Yahagi, K. Ohashi, M. Amemiya-Kudo, Y. Nakagawa, R. Nagai, T. Kadowaki, J. Osuga, and S. Ishibashi. 2008. Identification of neutral cholesterol ester hydrolase, a key enzyme removing cholesterol from macrophages. *J Biol Chem*. 283:33357-33364.
- Olkonen, V.M. 2004. Oxysterol binding protein and its homologues: new regulatory factors involved in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 15:321-327.
- Oram, J.F. 2002. ABCA1 as a New Therapeutic Target for Treating Cardiovascular Disease. *Drug news & perspectives*. 15:24-28.
- Oram, J.F., and A.M. Vaughan. 2006. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res*. 99:1031-1043.
- Ouimet, M., V. Franklin, E. Mak, X. Liao, I. Tabas, and Y.L. Marcel. 2011. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab*. 13:655-667.
- Ouimet, M., and Y.L. Marcel. 2012. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32:575-581.
- Ozeki, S., J. Cheng, K. Tauchi-Sato, N. Hatano, H. Taniguchi, and T. Fujimoto. 2005. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci*. 118:2601-2611.
- Pankiv, S., E.A. Alemu, A. Brech, J.A. Bruun, T. Lamark, A. Overvatn, G. Bjorkoy, and T. Johansen. 2010. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol*. 188:253-269.
- Parton, R.G., and M.A. del Pozo. 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14:98-112.
- Parton, R.G., and K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:185-194.
- Pennings, M., I. Meurs, D. Ye, R. Out, M. Hoekstra, T.J. Van Berkel, and M. Van Eck. 2006. Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS letters*. 580:5588-5596.
- Peralta, E.R., B.C. Martin, and A.L. Edinger. 2010. Differential effects of TBC1D15 and mammalian Vps39 on Rab7 activation state, lysosomal morphology, and growth factor dependence. *J Biol Chem*. 285:16814-16821.

- Popoff, V. 2008. Tri endosomal multi-étapes entre l'endosome précoce et l'appareil de Golgi. In FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD. Vol. Docteur. UNIVERSITE PARIS XI
- Poteryaev, D., S. Datta, K. Ackema, M. Zerial, and A. Spang. 2010. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell*. 141:497-508.
- Pryor, P.R., B.M. Mullock, N.A. Bright, M.R. Lindsay, S.R. Gray, S.C. Richardson, A. Stewart, D.E. James, R.C. Piper, and J.P. Luzio. 2004. Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Rep*. 5:590-595.
- Rader, D.J., E.T. Alexander, G.L. Weibel, J. Billheimer, and G.H. Rothblat. 2009. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res*. 50 Suppl:S189-194.
- Radhakrishnan, A., J.L. Goldstein, J.G. McDonald, and M.S. Brown. 2008. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab*. 8:512-521.
- Radhakrishnan, A., Y. Ikeda, H.J. Kwon, M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:6511-6518.
- Radhakrishnan, A., L.P. Sun, H.J. Kwon, M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 2004. Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell*. 15:259-268.
- Raiborg, C., and H. Stenmark. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. 458:445-452.
- Recchi, C., and M.C. Seabra. 2012. Novel functions for Rab GTPases in multiple aspects of tumour progression. *Biochem Soc Trans*. 40:1398-1403.
- Rieder, S.E., L.M. Banta, K. Kohrer, J.M. McCaffery, and S.D. Emr. 1996. Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast vps28 vacuolar protein sorting mutant. *Mol Biol Cell*. 7:985-999.
- Robinet, P., A. Fradagrada, M.N. Monier, M. Marchetti, A. Cogny, N. Moatti, J.L. Paul, B. Védie, and C. Lamaze. 2006. Dynamin is involved in endolysosomal cholesterol delivery to the endoplasmic reticulum: role in cholesterol homeostasis. *Traffic*. 7:811-823.
- Rojas, R., T. van Vlijmen, G.A. Mardones, Y. Prabhu, A.L. Rojas, S. Mohammed, A.J. Heck, G. Raposo, P. van der Sluijs, and J.S. Bonifacino. 2008. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol*. 183:513-526.
- Romero Rosales, K., E.R. Peralta, G.G. Guenther, S.Y. Wong, and A.L. Edinger. 2009. Rab7 activation by growth factor withdrawal contributes to the induction of apoptosis. *Mol Biol Cell*. 20:2831-2840.
- Rosenfeld, J.L., R.H. Moore, K.P. Zimmer, E. Alpizar-Foster, W. Dai, M.N. Zarka, and B.J. Knoll. 2001. Lysosome proteins are redistributed during expression of a GTP-hydrolysis-defective rab5a. *J Cell Sci*. 114:4499-4508.
- Saint-Pol, A., B. Yelamos, M. Amessou, I.G. Mills, M. Dugast, D. Tenza, P. Schu, C. Antony, H.T. McMahon, C. Lamaze, and L. Johannes. 2004. Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev Cell*. 6:525-538.
- Sandvig, K., O. Garred, K. Prydz, J.V. Kozlov, S.H. Hansen, and B. van Deurs. 1992. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature*. 358:510-512.
- Saxena, S., C. Bucci, J. Weis, and A. Kruttgen. 2005. The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:10930-10940.
- Schmid, S.L., M.A. McNiven, and P. De Camilli. 1998. Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol*. 10:504-512.

- Schmitz, G., and M. Grandl. 2009. The molecular mechanisms of HDL and associated vesicular trafficking mechanisms to mediate cellular lipid homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:1718-1722.
- Seaman, M.N. 2004. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol.* 165:111-122.
- Seaman, M.N., M.E. Harbour, D. Tattersall, E. Read, and N. Bright. 2009. Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J Cell Sci.* 122:2371-2382.
- Seaman, M.N., J.M. McCaffery, and S.D. Emr. 1998. A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol.* 142:665-681.
- Shashkin, P., B. Dragulev, and K. Ley. 2005. Macrophage differentiation to foam cells. *Current pharmaceutical design.* 11:3061-3072.
- Sheng, Z., H. Otani, M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 1995. Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:935-938.
- Shimomura, I., H. Shimano, J.D. Horton, J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 1997. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest.* 99:838-845.
- Singh, R., S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A.M. Cuervo, and M.J. Czaja. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 458:1131-1135.
- Sinha, B., D. Koster, R. Ruez, P. Gonnord, M. Bastiani, D. Abankwa, R.V. Stan, G. Butler-Browne, B. Védie, L. Johannes, N. Morone, R.G. Parton, G. Raposo, P. Sens, C. Lamaze, and P. Nassoy. 2011. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell.* 144:402-413.
- Sivars, U., D. Aivazian, and S.R. Pfeffer. 2003. Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature.* 425:856-859.
- Smart, E.J., Y. Ying, W.C. Donzell, and R.G. Anderson. 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem.* 271:29427-29435.
- Smith, J.D., W. Le Goff, M. Settle, G. Brubaker, C. Waelde, A. Horwitz, and M.N. Oda. 2004. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 45:635-644.
- Soccio, R.E., and J.L. Breslow. 2004. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1150-1160.
- Song, B.L., N.B. Javitt, and R.A. DeBose-Boyd. 2005. Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.* 1:179-189.
- Sonnichsen, B., S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf, and M. Zerial. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol.* 149:901-914.
- Souidi, M., S. Dubrac, M. Parquet, D.H. Volle, J.M. Lobaccaro, D. Mathe, O. Combes, P. Scanff, C. Lutton, and J. Aigueperse. 2004. [Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]. *Gastroenterol Clin Biol.* 28:279-293.
- Steck, T.L., and Y. Lange. 2010. Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol. *Trends Cell Biol.* 20:680-687.
- Stein, M.P., J. Dong, and A. Wandinger-Ness. 2003. Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Advanced drug delivery reviews.* 55:1421-1437.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:513-525.
- Storch, J., and Z. Xu. 2009. Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta.*
- Sugii, S., P.C. Reid, N. Ohgami, H. Du, and T.Y. Chang. 2003. Distinct endosomal compartments in early trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem.* 278:27180-27189.

- Sun, L.P., J. Seemann, J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:6519-6526.
- Tabas, I. 2002. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*. 110:905-911.
- Tall, A.R. 2008. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med*. 263:256-273.
- Terasaka, N., N. Wang, L. Yvan-Charvet, and A.R. Tall. 2007. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:15093-15098.
- Toulmay, A., and W.A. Prinz. 2011. Lipid transfer and signaling at organelle contact sites: the tip of the iceberg. *Curr Opin Cell Biol*. 23:458-463.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:4350-4354.
- Treguier, M., C. Doucet, M. Moreau, C. Dacet, J. Thillet, M.J. Chapman, and T. Huby. 2004. Transcription Factor Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 Regulates Scavenger Receptor Cla-1 Gene Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- Ungermann, C., and D. Langosch. 2005. Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci*. 118:3819-3828.
- Urano, Y., H. Watanabe, S.R. Murphy, Y. Shibuya, Y. Geng, A.A. Peden, C.C. Chang, and T.Y. Chang. 2008. Transport of LDL-derived cholesterol from the NPC1 compartment to the ER involves the trans-Golgi network and the SNARE protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:16513-16518.
- van Berkel, T.J., R. Out, M. Hoekstra, J. Kuiper, E. Biessen, and M. van Eck. 2005. Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol*. 16:525-535.
- van Meer, G. 2001. Caveolin, cholesterol, and lipid droplets? *J Cell Biol*. 152:F29-34.
- Vanier, M.T., and G. Millat. 2003. Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet*. 64:269-281.
- Vanlandingham, P.A., and B.P. Ceresa. 2009. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem*. 284:12110-12124.
- Vaughan, A.M., and J.F. Oram. 2006. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res*. 47:2433-2443.
- Verhoeven, K., P. De Jonghe, K. Coen, N. Verpoorten, M. Auer-Grumbach, J.M. Kwon, D. FitzPatrick, E. Schmedding, E. De Vriendt, A. Jacobs, V. Van Gerwen, K. Wagner, H.P. Hartung, and V. Timmerman. 2003. Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet*. 72:722-727.
- Vihervaara, T., M. Jansen, R.L. Uronen, Y. Ohsaki, E. Ikonen, and V.M. Olkkonen. 2011. Cytoplasmic oxysterol-binding proteins: sterol sensors or transporters? *Chem Phys Lipids*. 164:443-450.
- Vitelli, R., M. Santillo, D. Lattero, M. Chiariello, M. Bifulco, C.B. Bruni, and C. Bucci. 1997. Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J Biol Chem*. 272:4391-4397.
- von Kleist, L., W. Stahlschmidt, H. Bulut, K. Gromova, D. Puchkov, M.J. Robertson, K.A. MacGregor, N. Tomilin, A. Pechstein, N. Chau, M. Chircop, J. Sakoff, J.P. von Kries, W. Saenger, H.G. Krausslich, O. Shupliakov, P.J. Robinson, A. McCluskey, and V. Haucke. 2011. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*. 146:471-484.
- Walter, M., J.P. Davies, and Y.A. Ioannou. 2003. Telomerase immortalization upregulates Rab9 expression and restores LDL cholesterol egress from Niemann-Pick C1 late endosomes. *J Lipid Res*. 44:243-253.

- Wang, M.D., R.S. Kiss, V. Franklin, H.M. McBride, S.C. Whitman, and Y.L. Marcel. 2007. Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways. *J Lipid Res.* 48:633-645.
- West, M.A., M.S. Bretscher, and C. Watts. 1989. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol.* 109:2731-2739.
- Wurmser, A.E., T.K. Sato, and S.D. Emr. 2000. New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol.* 151:551-562.
- Yang, J., M.S. Brown, Y.K. Ho, and J.L. Goldstein. 1995. Three different rearrangements in a single intron truncate sterol regulatory element binding protein-2 and produce sterol-resistant phenotype in three cell lines. Role of introns in protein evolution. *J Biol Chem.* 270:12152-12161.
- Yokoyama, S. 2006. ABCA1 and biogenesis of HDL. *J Atheroscler Thromb.* 13:1-15.
- Yvan-Charvet, L., M. Ranalletta, N. Wang, S. Han, N. Terasaka, R. Li, C. Welch, and A.R. Tall. 2007. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest.* 117:3900-3908.
- Zerial, M., and H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:107-117.
- Zhao, B., J. Song, R.W. St Clair, and S. Ghosh. 2007. Stable overexpression of human macrophage cholesteryl ester hydrolase results in enhanced free cholesterol efflux from human THP1 macrophages. *American journal of physiology. Cell physiology.* 292:C405-412.