UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DE L'APOLIPOPROTÉINE C-I SUR LE MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES DE FAIBLE ET DE HAUTE DENSITÉ DANS LES CELLULES HepG2

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
VENETA KRASTEVA

MAI 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

En préambule, j'aimerais exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de recherche, Madame Louise Brissette. Ce travail n'aurait pas vu le jour sans ses conseils précieux, ses encouragements et la confiance qu'elle m'a accordée. Je voudrais la remercier pour son soutien sans faille, de m'avoir guidé et de m'avoir fourni les meilleures conditions pour la réalisation de ce projet.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à notre assistante de recherche, Madame Louise Falstrault, qui par sa rigueur scientifique, sa grande disponibilité et son soutien technique a fortement enrichi ma formation.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mathieu Brodeur qui m'a apporté un soutien moral fait de suggestions et de conseils précieux montrant l'intérêt qu'il portait à cette étude.

Merci à Vilay pour son aide indispensable pour les expériences in vivo, et au reste de l'équipe, Pascale, Félix et Léo, pour la bonne humeur qu'ils ont su maintenir au quotidien.

Mes pensées vont aussi à Manef et à ma famille qui, par leur soutien sans faille m'ont permis d'aller jusqu'au bout de mes projets.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....vii
LISTE DES FIGURES.....viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....x
RÉSUMÉ..... xii
INTRODUCTION..... 1
CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES.....3
1.1. LES LIPOPROTÉINES..... 3
1.2. LES APOLIPOPROTÉINES..... 7
1.2.1. Les apolipoprotéines A..... 7
1.2.1.1. L'apolipoprotéine A-I..... 7
1.2.1.2. L'apolipoprotéine A-II..... 8
1.2.1.3. L'apolipoprotéine A-IV..... 8
1.2.2. Les apolipoprotéines B..... 9
1.2.2.1. L'apolipoprotéine B_{100}..... 9
1.2.2.2. L'apolipoprotéine B_{48}..... 9
1.2.3. L'apolipoprotéine E..... 10
1.2.4. Les apolipoprotéines C..... 10
1.2.4.1. L'apolipoprotéine C-II.....10
1.2.4.2. L'apolipoprotéine C-III..... 10
1.2.4.3. L'apolipoprotéine C-I..... 11
1.2.4.3.1. Caractéristiques générales..... 11
1.2.4.3.2. Structure et gène..... 12
1.2.4.3.3. Souris transgéniques et « knock-out » en apoC-I.....14

1.3. RÉCEPTEURS HÉPATIQUES IMPLIQUÉS DANS LE MÉTABOLISME DU CHOLESTÉROL..... 15

1.3.1. Le récepteur des LDL (rLDL) : captation globale..... 16

1.3.2. Les récepteurs potentiels des HDL : captation globale..... 17

1.3.3. La captation sélective et les récepteurs impliqués..... 18

1.3.3.1. Le récepteur « scavenger » de classe B type I (SR-BI)..... 19

1.3.3.2. Le « cluster of differentiation 36 » (CD36) 21

1.4. BUT GÉNÉRAL DU PROJET ET INFORMATIONS PERTINENTES SUR LE MODÈLE UTILISÉ ET LA TECHNIQUE DE L'INTERFÉRENCE PAR L'ARN..... 22

1.5. HYPOTHÈSES QUI PRÉCÉDAIENT LE TRAVAIL..... 24

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES..... 25

2.1. MATÉRIEL..... 25

2.1.1. Culture cellulaire..... 25

2.1.2. Préparation des lipoprotéines..... 26

2.1.3. Marquage radioactif des lipoprotéines..... 26

2.1.4. Obtention de transformants stables et transitoires exprimant différents niveaux d'apoC-I..... 27

2.1.4.1. Cellules HepG2 sur-exprimant l'ADNc de l'apoC-I (transfection stable) 27

2.1.4.1.1. Synthèse de l'ADNc de l'apoC-I par RT-PCR à partir de cellules HepG2 et digestion du vecteur pcDNA 3.1(-)..... 27

2.1.4.1.2. Ligation et transformation bactérienne. 29

2.1.4.1.3. Transfection du vecteur pcDNA3.1(-)/ADNc de l'apoC-I dans des cellules HepG2. 29

2.1.4.2. Cellules HepG2 sous-exprimant l'ADNc de l'apoC-I (transfection transitoire) 30

2.1.4.2.1. Sélection de siRNA susceptibles d'inhiber l'expression du gène de l'apoC-I. 30

2.1.4.2.2. Transfection de siRNA dirigés contre l'ARNm de l'apoC-I dans des cellules HepG2. 31

2.2. MÉTHODES..... 31

2.2.1. Mesure du niveau d'expression de la protéine apoC-I sécrétée par ELISA « Enzyme linked immunosorbent assay » non compétitif..... 31

2.2.2. Essais d'association et de dégradation..... 33

2.2.3. Essais d'association et de dégradation avec du milieu MEM enrichi en apoC-I 34

2.2.4. Mesure du niveau d'expression des récepteurs SR-BI, rLDL et CD36...35

2.2.5. Clairance des LDL et des HDL_3 en présence de l'apoC-I purifiée..... 36

2.2.5.1. Injection in vivo des lipoprotéines avec de l'apoC-I purifiée..... 36

2.2.5.2. Analyse plasmatique des lipoprotéines marquées..... 36

2.2.5.3. Mesure de la radioactivité associée aux éthers de cholestérol tritiés dans le foie, les intestins et l'estomac..... 37

2.2.6. Analyse de liaison de l'apoC-I purifiée aux cellules HepG2 et aux lipoprotéines..... 38

2.2.6.1. Marquage radioactif de l'apoC-I purifiée..... 38

2.2.6.2. Essais de liaison de l'apoC-I aux cellules HepG2..... 38

2.2.6.3. Essais d'association de l'apoC-I aux LDL et aux HDL_3..... 39

2.2.7. Autres méthodes..... 39

CHAPITRE III : RÉSULTATS..... 40

3.1. IMPLICATION DE L'APOC-I PURIFIÉE DANS L'ASSOCIATION ET LA DÉGRADATION DES LDL ET DES HDL_3..... 40

3.2. OBTENTION DE TRANSFORMANTS STABLES ET TRANSITOIRES EXPRIMANT DIFFÉRENTS NIVEAUX D'APOC-I ENDOGÈNE..... 49

3.2.1. Conception d'un modèle cellulaire contenant l'ADNc de l'apoC-I en orientation sens..... 49

3.2.2. Obtention de transformants transitoires sous-exprimant l'apoC-I..... 50

3.3. NIVEAU DE SÉCRÉTION DE L'APOC-I DES CELLULES HepG2 TRANSFECTÉES AVEC LE VECTEUR RECOMBINANT CONTENANT L'ADNc DE L'APOC-I..... 54

3.4. NIVEAU DE SÉCRÉTION DE L'APOC-I DES CELLULES HEPG2 TRANSFECTÉES AVEC DES siRNA DIRIGÉS CONTRE L'ARNm DE L'APOC-I..... 55

3.5. MÉTABOLISME DES LDL ET DES HDL_3 PAR DES CELLULES HepG2 EXPRIMANT DIFFÉRENTS NIVEAUX DE L'APOC-I..... 56

3.6. NIVEAU D'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS SR-BI, rLDL ET CD36 DANS LES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES HepG2..... 62

3.7. IMPACT D'UN MILIEU ENRICHI EN APOC-I ENDOGÈNE SUR LE MÉTABOLISME DES LDL ET DES HDL_3 DANS DES CELLULES HepG2..... 65

3.8. IMPLICATION DE L'APOC-I DANS LE MÉTABOLISME DES LDL ET DES HDL_3 IN VIVO..... 76

3.8.1. Clairances plasmatiques des HDL_3 en présence de l'apoC-I purifiée..... 76

3.8.2. Clairances plasmatiques des LDL en présence de l'apoC-I purifiée..... 79

3.8.3. Implication de l'apoC-I dans la clairance des HDL_3 au niveau du foie, des intestins et de l'estomac. 80

3.9. LIAISON DE L'APOC-I PURIFIÉE AUX CELLULES HepG2 ET AUX LIPOPROTÉINES..... 82

CHAPITRE IV : DISCUSSION..... 85

4.1. Effet de l'apoC-I purifiée sur le métabolisme des LDL par les cellules HepG2 85

4.2. Effet de l'apoC-I purifiée sur le métabolisme des HDL_3 par les cellules HepG2 88

4.3. Impact de la présence endogène de l'apoC-I sur le métabolisme des LDL.....88

4.4. Impact de la présence endogène de l'apoC-I sur le métabolisme des HDL_3...90

4.5. Étude in vivo de l'effet de l'apoC-I sur le métabolisme des LDL et HDL... 91

4.6. Effet physiologique potentiel de l'apoC-I et interventions thérapeutiques possibles dans le traitement des hypercholestérolémie..... 92

CONCLUSION..... 94

BIBLIOGRAPHIE..... 95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les principales caractéristiques des différentes lipoprotéines dans le plasma humain 4

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure du locus des gènes apoE/C-I/C-II. 13
Figure 2. Représentation schématique des amorces sens et antisens du gène de l'apoC-I, utilisées pour réaliser la RT-PCR à partir d'un pool de l'ARNm de cellules HepG2. ... 28
Figure 3. Représentation schématique d'un duplex d'amorces de siRNA dirigé contre l'ARNm d'apoC-I. 30
Figure 4: Influence de différentes concentrations d'apoC-I purifiée sur le métabolisme des LDL et des HDL_3 dans des cellules HepG2 43
Figure 5 : Effet de différentes concentrations d'apoE purifiée sur le métabolisme des LDL dans des cellules HepG2 45
Figure 6 : Effet de différentes concentrations d'apoA-I purifiée sur le métabolisme des LDL dans des cellules HepG2 48
Figure 7 : Représentation schématique du vecteur d'expression eucaryote pcDNA 3.1(-) 50
Figure 8 : Analyse de l'ADN du vecteur d'expression pcDNA 3.1. 51
Figure 9 : Analyse de la RT-PCR de l'ADNc de l'apoC-I par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. 51
Figure 10 : Analyse de l'ADN du vecteur recombinant pcDNA 3.1_apoC-I. 52
Figure 11 : Représentation schématique du vecteur recombinant pcDNA 3.1_apoC-I contenant l'ADNc humain de l'apoC-I, selon une orientation sens. 53
Figure 12 : Séquence nucléotidique obtenue par séquençage du vecteur pcDNA 3.1 contenant l'ADNc de l'apoC-I humaine. 53
Figure 13 : Quantification par ELISA du taux de l'apoC-I sécrétée dans le milieu extracellulaire par les cellules HepG2, les cellules HepG2 transfectées avec les vecteur vide (contrôle) et les cellules HepG2 transfectées avec le vecteur recombinant contenant l'ADNc de l'apoC-I (apoC-I 2.9 et apoC-I 3.8). 54
Figure 14 : Quantification par ELISA du taux de l'apoC-I sécrétée dans le milieu extracellulaire par les cellules HepG2, les cellules HepG2 transfectées avec des siRNA

non spécifiques de l'ARNm de l'apoC-I (contrôle négatif) ou transfectées avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de l'apoC-I. 55
Figure 15 : Effet de l'apoC-I endogène sur le métabolisme des LDL et des HDL_3. 58
Figure 16 : Effet de l'inhibition de l'apoC-I par la technique de l'ARNi sur le métabolisme des LDL et des HDL_3. 61
Figure 17 : Niveau d'expression des récepteurs SR-BI , rLDL et CD36 dans les différents types de cellules HepG2. 64
Figure 18 : Niveau d'expression des récepteurs SR-BI, rLDL et CD36 dans des cellules HepG2 transfectées avec des siRNA non spécifiques de l'ARNm de l'apoC-I (contrôle) ou transfectées avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de l'apoC-I. 65
Figure 19. Essais d'association et de dégradation des LDL et des HDL_3 en présence de milieu enrichi ou non en apoC-I endogène. 67
Figure 20 : Effet d'un milieu enrichi en apoC-I sur le métabolisme des LDL et des HDL_3. 70
Figure 21 : Effet d'une pré-incubation du milieu enrichi en apoC-I avec les lipoprotéines sur le métabolisme des HDL_3 et des LDL. 73
Figure 22 : Effet d'une pré-incubation des cellules sur-exprimant l'apoC-I dans un milieu MEM sans sérum de bœuf fœtal sur le métabolisme des LDL et des HDL_3. 75
Figure 23 : Clairance plasmatique de [^{3}H]-CEt-HDL_3 et [^{125}I]-HDL_3 injectées chez des souris femelles en absence ou en présence de 50 µg d'apoC-I. 78
Figure 24 : Clairance plasmatique de [^{3}H]-CEt-LDL injectées chez des souris femelles en absence ou en présence de 30 µg d'apoC-I. 80
Figure 25 : Implication de l'apoC-I dans la clairance des [^{3}H]-CEt-HDL_3 et [^{125}I]-HDL_3 chez des souris femelles. 81
Figure 26 : Liaison spécifique de [^{125}I]-apoC-I aux cellules HepG2. 83
Figure 27 : Autoradiographie de la migration des LDL et des HDL_3 incubées pendant 4 heures à 37° C en présence de 2,5 µg/ml de [^{125}I]-apoC-I. 84

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCA1	Cassette de transport A-I liant l'ATP
ACAT	Acyl-coenzyme A: cholestérol acyltransférase
Apo	Apolipoprotéine
BSA	Albumine de sérum bovin
CD36	Récepteur "cluster of differentiation" 36
EC	Esters de cholestérol
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol
CHO	Cellules d'ovaire de hamster chinois
CL	Cholestérol libre
COS	Lignée de cellules rénales de singe
EGF	Facteur de croissance épidermale
ELISA	Essai immunoabsorbant d'enzymes liées
HBP	Protéine de liaison des lipoprotéines de haute densité
HDL	Lipoprotéines de haute densté
HepG2	Cellules d'hépatome humain
HF	Hypercholestérolémie familiale
HMG-CoA	Hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A
IDL	Lipoprotéines de densité intermédiaire
LCAT	Lécithine : cholestérol acyl transférase

LDL	Lipoprotéines de faible densité
LH	Lipase hépatique
LPL	Lipoprotéine lipase
LRP	Protéine apparentée au récepteur des LDL
NDGGE	Gel d'électrophorèse de gradient non dénaturant
PBS	Tampon sodium phosphate
PLA2	Phospholipase A_2
RCT	Transport inverse du cholestérol
RISC	Complexe ribonucléoprotéique d'inhibition induit par l'ARN
rLDL	Récepteur des lipoprotéines de faible densité
rVLDL	Récepteur des lipoprotéines de très faible densité
SDS-PAGE	Gel de polyacrylamide contenant du sodium dodécyl sulfate
siRNA	Petits ARN interférents
SR-BI	Récepteur « scavenger » de classe B type I
TBS	Tampon salin
TCA	Acide trichloracétique
TG	Triglycérides
VLDL	Lipoprotéines de très faible densité
WHHL	Hyperlipidémie héréditaire Watanabe

RÉSUMÉ

Le cholestérol, molécule complexe, est depuis longtemps associé aux maladies cardiovasculaires. Bien qu'il ait des effets bénéfiques lorsqu'il est, par exemple, précurseur de sels biliaires, de la vitamine D et d'autres stéroïdes, s'il est en excès dans le sang, il peut être à l'origine de la formation de plaques athéromateuses. Le transport du cholestérol dans la circulation est assuré par les lipoprotéines qui sont évacuées de la circulation par des récepteurs spécifiques au niveau du foie. Le récepteur de lipoprotéines de faible densité (LDL) mène à la captation et à la dégradation complète de la particule, tandis que le récepteur « scavenger » de classe B type I (SR-BI) est capable de retirer de façon sélective les esters de cholestérol des LDL et des lipoprotéines de haute densité (HDL). Les lipoprotéines sont reconnues par ces récepteurs grâce aux apolipoprotéines (apo) présentes à la surface de la particule. Des études antérieures ont démontré que l'apoC-I peut inhiber la captation de lipoprotéines riches en triglycérides et moduler l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol. L'objectif de la présente étude est d'examiner si les différents taux de sécrétion d'apoC-I par les cellules hépatiques induisent un changement au niveau du métabolisme des LDL et des HDL. Des essais de captation des HDL et des LDL par des cellules d'hépatome humain HepG2 ont été réalisés en présence de concentrations croissantes d'apoC-I purifiées. Ces essais ont démontré une diminution dose dépendante de la captation sélective des esters de cholestérol des LDL et des HDL (95 % et 98% d'inhibition respectivement, en présence de 5 µg/ml d'apoC-I), sans provoquer de changement dans l'association protéique et la dégradation de ces lipoprotéines. Pour caractériser l'impact des différents taux de sécrétion d'apoC-I endogène, des transformants stables de cellules HepG2 ont été obtenus exprimant 290 % et 380 % du niveau d'apoC-I secrétée par les cellules HepG2. D'autre part, l'expression de cette apolipoprotéine a été inhibée de 55 % de son niveau d'expression par les cellules HepG2 en utilisant la stratégie des siRNA (*short interfering RNA*). Les essais d'association et de dégradation des HDL et des LDL par ces différents types de cellules ont démontré qu'une diminution de l'expression de l'apoC-I induit une augmentation de la captation sélective des esters de cholestérol des HDL de 29 % par rapport à celle des cellules contrôles. Les associations protéique et lipidique des LDL ont été aussi plus élevées pour les cellules sous-exprimant l'apoC-I (23 % et 15 % d'augmentation respectivement). Contrairement aux résultats obtenus avec les cellules sous-exprimant l'apoC-I, le métabolisme des lipoprotéines n'a pas été modifié dans les cellules sur-exprimant l'apoC-I. Les analyses de clairances plasmatiques des LDL et des HDL injectées à des souris, réalisées en présence d'apoC-I purifiée, visant à élucider l'impact de cette apolipoprotéine dans le métabolisme des lipoprotéines *in vivo*, n'ont pas donné les résultats escomptés. D'autre part, les essais de liaison de l'apoC-I marquée à l'iode-125 aux cellules HepG2 ont révélé que cette apolipoprotéine se lie de façon spécifique à la membrane plasmique de ces cellules. De plus, les résultats d'incubation des LDL et des HDL en présence de cette apoC-I marquée ont démontré que celle-ci s'associe également aux lipoprotéines.

Enfin, la définition du rôle de l'apoC-I dans le métabolisme des HDL et des LDL pourrait mener à une intervention d'ordre thérapeutique visant à diminuer le taux de synthèse de cette apolipoprotéine, et ainsi diminuer le taux de cholestérol sanguin et en conséquence l'incidence de maladies cardiovasculaires.

Mots clés : LDL, HDL, apolipoprotéines, cholestérol, captation sélective

INTRODUCTION

Les lipides représentent une source majeure d'énergie pour l'organisme humain et sont des constituants majeurs de la structure des cellules. Le cholestérol (CL) est un composant essentiel à la fabrication des membranes cellulaires, ainsi que le précurseur des acides biliaires, de la vitamine D et des hormones stéroïdiennes. Son transport dans le sang est assuré par les lipoprotéines qui sont évacuées de la circulation par des récepteurs spécifiques au niveau du foie. De nombreuses études ont démontré que le récepteur de LDL (rLDL), qui mène à la captation et à la dégradation complète de la particule, est un élément important pour le maintien d'un taux normal de LDL-CL. Des études plus récentes ont démontré que le récepteur « scavenger » de classe B type I (SR-BI) est capable de retirer de façon sélective les esters de cholestérol (EC) des LDL. Ce récepteur a donc aussi un potentiel intéressant pour le maintien d'un niveau normal de LDL-CL. Contrairement aux autres lipoprotéines, les HDL ont la capacité de lier le CL en excès des cellules périphériques et de le ramener vers le foie pour élimination ou excrétion. Ceci explique pourquoi le taux sanguin de HDL est corrélé négativement à l'incidence de maladies cardiovasculaires. Des récepteurs, tels le SR-BI et le « cluster of differentiation » 36 (CD36) permettent aussi la captation sélective des EC des HDL.

Les lipoprotéines sont reconnues par les récepteurs hépatiques grâce aux apolipoprotéines (apo) présentes à la surface des particules. De nombreuses études ont été menées sur les apoE, apoB et apoA-I, révélant leurs rôles dans le développement de l'hyperlipidémie et l'athérosclérose. Moins d'attention a été accordée aux apoCs, et plus particulièrement à l'apoC-I. En effet, des essais dans les années 1980 ont démontré que l'apoC-I peut inhiber la captation de lipoprotéines riches en triglycérides et moduler l'activité d'enzymes impliquées dans le transport du cholestérol des cellules extrahépatiques vers le foie. Le présent projet a pour objectif d'examiner si les différents taux de sécrétion d'apoC-I humaine par la cellule hépatique induisent un changement au niveau du métabolisme des LDL et des HDL_3. L'apoC-I libérée dans le milieu extracellulaire pourrait s'associer aux LDL et HDL_3 et augmenter ou diminuer leur liaison/association aux récepteurs hépatiques ou bien pourrait

orienter les lipoprotéines vers un autre récepteur. Dans ce but, nous avons créé des cellules HepG2 (hépatome humain) qui sous-expriment l'apoC-I par une technique d'interférence par l'ARN, et des cellules qui sur-expriment l'apoC-I par une méthode d'expression de gène. Ces deux sous-types cellulaires ont permis de comparer le métabolisme des LDL et des HDL_3 avec celui des cellules HepG2 normales. Pour déterminer l'implication de l'apoC-I dans le métabolisme *in vivo* des LDL et des HDL_3, l'apolipoprotéine a été injectée dans des souris femelles, et des analyses de clairances plasmatiques des lipoprotéines ont été effectuées. Enfin, la liaison de l'apoC-I aux cellules HepG2 et ses associations aux LDL et aux HDL_3 ont été étudiées.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1. LES LIPOPROTÉINES

Les esters de cholestérol (EC) et les triglycérides (TG) sont des molécules apolaires, donc insolubles dans l'eau. Pour être mobiles dans le milieu aqueux du plasma, elles doivent se lier à des protéines amphipatiques, les apolipoprotéines (apo), ayant une région hydrophile et une région hydrophobe (Segrest et al., 1974). Ce complexe lipide-apolipoprotéine, nommé lipoprotéine, est responsable du transport des lipides de leur lieu de synthèse vers les tissus et les organes cibles. La particularité des lipoprotéines est d'être composées d'un noyau hydrophobe, comprenant les TG et les EC, entouré d'une monocouche de phospholipides, de CL et d'apolipoprotéines (Scanu et Landsberger, 1980).

Les éléments constituants les lipoprotéines ont un rôle fondamental dans le métabolisme de l'organisme. Le CL est le précurseur de produits cellulaires, tels que les hormones stéroïdiennes, les sels biliaires et la vitamine D, et participe à la régulation de la fluidité de la membrane plasmique. Les apos maintiennent la structure des lipoprotéines et sont reconnues par les récepteurs de lipoprotéines. Les TG sont une source d'énergie et les phospholipides sont des constituants des membranes plasmiques (Vance, D.E. et Vance, J.E., 1993).

Les différentes classes de lipoprotéines se distinguent en fonction de leurs densités, leurs compositions relatives en lipides et en protéines, leurs fonctions et leurs lieux de synthèse (Gotto, Pownall et Havel, 1986) (tableau 1).

Tableau 1. Les principales caractéristiques des différentes lipoprotéines dans le plasma humain

Lipoprotéines	Origine	Composante majeure	Diamètre (nm)	Densité (g/ml)	Types d'apos
Chylomicrons	Intestin	TG	~ 100->1000	<0,950	B_{48}, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III
VLDL	Foie	TG	~ 30 - 100	0,950-1,006	B_{100}, A-I, C-I, C-II, C-III, E
IDL	VLDL	EC	~ 35	1,006 – 1,019	B_{100}, C-I, C-II, C-III, E
LDL	IDL	EC	~ 22	1,006 – 1,063	B_{100}
HDL	Foie, intestin	EC, PL et Protéines	~ 8-11 (forme sphérique) ~18 (forme discoïdale)	1,063 – 1,120 (HDL_2) 1,120-1,210 (HDL_3)	A-I, A-II, A-IV, C-I, E

Tableau adapté de Small, 1992.

Les **chylomicrons**, de densité inférieure à 0,95 g/ml, sont synthétisés par les cellules de l'intestin, les entérocytes, à partir des lipides exogènes (provenant de l'alimentation). Ils sont riches en TG (85%) et pauvres en protéines (1-2%). L'apoC-II, présente à la surface des chylomicrons, active la lipoprotéine lipase (LPL) associée aux cellules endothéliales qui hydrolyse leurs TG (Mahley et al., 1984). Les lipoprotéines de très faible densité (« very low density lipoproteins », **VLDL**), sont synthétisées à partir de lipides endogènes (Gotto, Pownall et Havel, 1986) et sont secrétées par le foie et très peu par l'intestin (Windmueller, Herbert et Levy, 1973). Les VLDL sont constituées de 50-65% de TG, d'où leur faible densité de 0,95-1,006 g/ml. Au niveau plasmatique, les TG sont hydrolysés par la LPL, activée par l'apoC-II à leur surface, et par la lipase hépatique (LH), ce qui mène à la formation des lipoprotéines de densité intermédiaire (« intermediate density lipoproteins », **IDL**). Les IDL, de densité de 1,006-1,019 g/ml, sont peu abondantes dans le plasma humain (Sigurdsson, Nicoll et Lewis, 1975). Une partie des IDL est internalisée et dégradée par le foie via les récepteurs des LDL (rLDL) qui reconnaissent les apos B et E. D'autre part, les TG des IDL sont hydrolysés par les LH situées dans le foie, ce qui aboutit à la formation des lipoprotéines de faible densité (« low density lipoproteins », **LDL**).

Les LDL ont une densité de 1,019-1,063 g/ml et sont constituées de 35-40% d'EC (Vance, 1993). Elles s'associent aux rLDL via leur apo B_{100}. (Brown et al., 1974). La particule de LDL liée au rLDL est internalisée et dégradée dans les lysosomes (Goldstein, 1979), alors que le récepteur est recyclé vers la membrane plasmique où il s'unit aux puits de clathrine. Les LDL sont positivement associées aux maladies cardiovasculaires (Brown et al., 1979).

La dernière classe de lipoprotéines, les lipoprotéines de haute densité (« high density lipoproteins », **HDL**) se subdivise en deux sous-classes : les HDL_2, de densité de 1,063 à 1,125 g/ml, et les HDL_3, de 1,125 à 1,21 g/ml. Elles sont secrétées principalement par le foie et en faible quantité dans les intestins sous forme native (Windmueller et al., 1973, Malhey et al., 1970). Elles peuvent aussi provenir du catabolisme des chylomicrons et des VLDL (Havel et Hamilton, 1988). Les HDL commencent leur processus de maturation sous forme discoïdale (pré-β-HDL) et contiennent de l'apoA-I et des phospholipides (Barter et al., 2003 ;

Lawn et al., 1999). Les particules discoïdales sont converties en particules sphériques (HDL_2 ou HDL_3) via l'action de la lécithine : cholestérol acyl transférase (LCAT) qui estérifie le cholestérol à la surface de la HDL discoïdale (Glomset et al., 1966). Ces EC migrent alors au cœur de la HDL pour la rendre de plus en plus globulaire. Ainsi, la HDL en déficit de CL à sa surface acquière la capacité de retirer le cholestérol en excès des cellules périphériques, via l'interaction de l'apoA-I avec l'« ATP-Binding-Cassette-transporter-A-I » (ABCA1) (Oram et Vaugham, 2000) ou avec le SR-BI (Ji et al., 1997) et de ramener le cholestérol sous forme d'EC vers le foie et les organes stéroïdogéniques. Ce processus est nommé le transport inverse du cholestérol (« reverse cholesterol transport », RCT) (Eisenberg, 1984) et est considéré comme bénéfique.

Les lipoprotéines ont à leur surface différentes apolipoprotéines qui déterminent leur fonction et leur destin métabolique. Les VLDL provenant du foie contiennent de l'$apoB_{100}$ (Kane, 1983), de l'apoE et des apoCs en très petite quantité (Hamilton, 1972). Les IDL contiennent de l'$apoB_{100}$ et de l'apoE, alors que les LDL contiennent exclusivement de l'$apoB_{100}$ (Mahley et Innerarity, 1983). En général, les HDL contiennent des apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoE et apoCs (Mahley et Innerarity, 1983). Toutefois, la sous-classe des HDL_3 ne contient que de l'apoA-I et de l'apoA-II. Ces protéines sont décrites dans la section suivante, avec une attention plus particulière à l'apoC-I.

1.2. LES APOLIPOPROTÉINES

Le métabolisme des lipoprotéines est régulé et contrôlé par leurs constituantes protéiques, les apolipoprotéines. Celles-ci exercent plusieurs fonctions ;

- Elles solubilisent les lipides dans le milieu aqueux du plasma,
- Elles maintiennent la structure des complexes lipoprotéiques (Mahley et al., 1984),
- Elles servent de cofacteurs d'enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines (Havel et al., 1980),
- Elles servent de ligands pour les récepteurs cellulaires (Mahley et al., 1983).

Les apos sont divisées en quatre familles (A, B, C, et E) selon la nomenclature proposée par Alaupovic (Alaupovic, 1972) qui les classifie selon le degré d'homologie de leurs séquences en acides aminés. De plus, les apos peuvent être différenciées en deux classes, les échangeables et les non-échangeables, suivant leur caractère de solubilité ou d'insolubilité dans le milieu. Les apoB_{48} et B_{100} sont des molécules insolubles en milieu aqueux, donc non-échangeables, qui restent liées à la lipoprotéine pendant tout le métabolisme de cette dernière (Mahley et al., 1984). Les apos A, C et E sont solubles en milieu aqueux, et peuvent s'échanger entre les différentes classes de lipoprotéines (Mahley et al., 1984).

1.2.1. Les apolipoprotéines A

1.2.1.1. L'apolipoprotéine A-I

L'apoA-I est une protéine de 28 kDa composée de 243 acides aminés (Brewer et al., 1978). Son gène est localisé sur le chromosome 11, sur le locus des gènes apoA-I/C-III/A-AIV (Cheung et al., 1984). Synthétisée par le foie et les intestins, elle circule dans le plasma en tant que composante majeure des HDL, mais elle peut aussi s'associer aux chylomicrons

(Mahley et al., 1984). L'apoA-I est présente dans le plasma à une concentration de 10-15 µg/ml (Assmann, 1982), et a une demi-vie d'environ 4 jours (Fidge, 1980). C'est un cofacteur de la LCAT (Fielding et al., 1972) qui estérifie le cholestérol capté par les HDL lors de l'efflux de cholestérol des cellules périphériques (Glomset, 1968). L'apoA-I des HDL a aussi la capacité de stimuler cet efflux, grâce à son interaction avec le transporteur ABCA1 (Oram et Vaugham, 2000). C'est la première étape du transport inverse du cholestérol. Il a été démontré qu'une augmentation d'apoA-I élève le niveau de HDL, ce qui a comme effet d'inhiber le processus de développement de l'athérosclérose (Rubin et al., 1991). Les apolipoprotéines constituant les HDL – apoA-I, apoA-II et apoC-III – peuvent se lier aux récepteurs des HDL, et notamment à SR-BI (Xu et al., 1997).

1.2.1.2. L'apolipoprotéine A-II

L'apoA-II est la deuxième apolipoprotéine la plus abondante des HDL (20% de la masse protéique) mais elle peut aussi être associée aux chylomicrons et aux VLDL (Alaupovic et al., 1991). Elle est synthétisée par le foie et sa concentration plasmatique est d'environ de 3-4 µg/ml (Assmann, 1982). Son gène est situé sur le chromosome 1 (Lackner et al., 1984). Dans le plasma, l'apoA-II est présente sous forme d'un dimère (17 kDa) composé de deux chaînes identiques, de 77 acides aminés chacune, reliées par un pont disulfure (Lux et al., 1972). Les fonctions physiologiques de l'apoA-II demeurent encore mal connues (Castellini et Lusis, 2001). Certaines études rapportent une inhibition possible de l'efflux du cholestérol cellulaire par l'apoA-II (Lagrost et al., 1995), d'autres sa capacité de moduler l'activité de la LCAT (Soutar et al., 1975), de la LH (Jahn et al., 1983) et de la CETP (« Cholesteryl ester transfer protein ») (Mowri et al., 1996).

1.2.1.3. L'apolipoprotéine A-IV

L'apoA-IV humaine est synthétisée par les entérocytes (Green et al., 1980) en tant que protéine de 46 kDa composée de 376 acides aminés (Weisgraber et al., 1978). Sa

concentration plasmatique est d'environ 1,5 µg/ml (Assmann, 1982). Son gène est localisé sur le chromosome 11 (Karathanasis 1985). L'apoA-IV est surtout retrouvée à la surface des chylomicrons et des HDL. Elle stimule l'activation de la LPL (Sato et al., 2002), favorise l'efflux de cholestérol cellulaire via la voie du transporteur ABCA1 (Sten et al., 1986) et peut activer la LCAT (Chen et al.,1985; Steinmetz et al., 1985) et la CETP (Lagrost et al., 1990; Barter et al., 1988).

1.2.2. Les apolipoprotéines B

1.2.2.1. L'apolipoprotéine B_{100}

L'apoB_{100}, principalement synthétisée par le foie, est une protéine de 515 kDa composée de 4536 acides aminés (Sparks et Marsh, 1981 ; Chen et al., 1986). C'est le principal constituant protéique des LDL, mais elle est également retrouvée dans les fractions VLDL et IDL. Au niveau du plasma, elle est présente à des concentrations variant entre 7 et 10 µg/ml (Assmann, 1982). En fait, les VLDL et les LDL se lient aux récepteurs hépatiques grâce à l'apoB_{100} reconnue par le récepteur des LDL, le rLDL (Beisiegel et al., 1981).

1.2.2.2. L'apolipoprotéine B_{48}

Chez l'homme, l'apoB_{48} est synthétisée par les intestins et on la retrouve en circulation dans les chylomicrons et les résidus de chylomicrons. C'est une protéine de 240 kDa composée de 2152 acides aminés (Cladaras et al., 1986). Sa concentration plasmatique est inférieure à 0,5 µg/ml. L'apoB_{48} est le produit d'expression du même gène que l'apoB_{100}. En effet, l'apoB_{48} résulte d'une conversion (méthylation) de la cytosine en position 6457 en uracile dans l'ARNm de l'apoB_{100} (Powell et al., 1987). Cette modulation donne lieu à la création d'un nouveau codon stop (à la place de la glycine en position 2153), ce qui entraîne la traduction de seulement 48 % de l'ARN messager de l'apoB_{100}, excluant la partie C-terminale responsable de la liaison de l'apoB au rLDL (Brewer et al., 1991).

1.2.3. L'apolipoprotéine E

L'apoE est une protéine de 34 kDa composée de 299 acides aminés (Rall et al., 1982) et synthétisée à 75 % par le foie (Linton et al., 1991). Son gène est localisé sur le chromosome 19 (Das et al., 1985). Sa concentration plasmatique est de 0,5-0,8 µg/ml. L'apoE est retrouvée dans les chylomicrons, les VLDL et leurs résidus, ainsi qu'en association avec les HDL_2. C'est un ligand pour le rLDL (Mahley et Innerarity, 1977) et pour la protéine apparentée au rLDL, la LRP (« LDL-receptor-related protein ») (Herz et al., 1988), deux récepteurs hépatiques impliqués dans l'endocytose et la dégradation complète des lipoprotéines (captation globale). Des études *in vitro* indiquent que l'apoE favorise la captation sélective des EC des LDL et des HDL (Charpentier et al., 2000).

1.2.4. Les apolipoprotéines C

1.2.4.1. L'apolipoprotéine C-II

L'apoC-II est une protéine de 8,9 kDa (79 résidus d'acides aminés) principalement produite par le foie. Elle est présente dans le plasma humain à des concentrations d'environ 0,4 µg/ml (Nestel et Fidge, 1982). C'est un constituant des chylomicrons, des VLDL et des HDL (Schonfeld et al., 1979). Elle est impliquée dans la conversion des VLDL en LDL en activant la LPL (LaRosa et al., 1970), enzyme présente à la surface des cellules endothéliales. Des études *in vitro* montrent que l'apoC-II inhibe la liaison de l'apoE à la LRP (Weisgraber et al., 1990) et la liaison des lipoprotéines contenant l'apoB (VLDL+LDL) au rLDL (Clavey et al., 1995). *In vitro*, cette apo inhibe la captation sélective des EC des HDL_3 et des LDL (Huard et al., 2005).

1.2.4.2. L'apolipoprotéine C-III

Parmi les trois types d'apoC, l'apoC-III est la plus abondante dans le plasma, 1,2 µg/ml (Nestel et Fidge, 1982). Elle est synthétisée principalement par le foie et est retrouvée dans

les chylomicrons, les VLDL et les HDL (Schonfeld et al., 1979). Cette apo de 8,8 kDa inhibe l'activité de la LPL (Brown et Baginsky, 1972) et de la LH (Kinnumen et Ehnholm, 1976). Elle peut empêcher la liaison de l'apoE à la LRP (Weisgraber et al., 1990) et la liaison des lipoprotéines riches en apoB au rLDL (Clavey et al., 1995). Il a été démontré que l'apoC-III est un ligand du récepteur SR-BI (Xu et al., 1997) et d'un autre récepteur hépatique qui reste à identifier (Fang et Liu, 2000). Des recherches *in vitro* ont démontré que l'apoC-III inhibe la captation sélective des EC des HDL_3 et des LDL (Huard et al., 2005).

1.2.4.3. L'apolipoprotéine C-I

1.2.4.3.1. Caractéristiques générales

L'apoC-I est la plus petite apolipoprotéine humaine; seulement 6,6 kDa (57 résidus d'acides aminés). Le plasma humain contient environ 60 µg/ml de cette apo (Curry et al., 1981) provenant principalement de la synthèse hépatique. Chez des sujets à jeun, 80-90% de la masse d'apoC-I est distribuée dans les HDL, et 5-10 % est associée aux VLDL (Malmendier et al., 1986). Des expériences *in vitro* montrent que les apoCs peuvent être transférées réversiblement entre les VLDL et les HDL (Eisenberg et al., 1979; Wu et Windmueller, 1979). Cet effet a été initialement démontré pour l'apoC-II et l'apoC-III et confirmé plus tard pour l'apoC-I (McKeone et al., 1988). D'autre part, il a été démontré que l'apoC-I est une activatrice secondaire de la LCAT *in vitro* (Soutar et al., 1975) et une inhibitrice potentielle de la LPL (Havel et al., 1973) et de la CETP (Kushwaha et al., 1993) .

L'apoC-I a aussi pour rôle d'inhiber la phospholipase A_2 (PLA_2, une lipase intestinale) et la LH. L'inhibition de la LH permet de protéger les TG d'une hydrolyse et de les réserver pour la LPL, qui est activée par l'apoC-II. Ainsi l'action de la LH est dirigée vers l'élimination des résidus de VLDL après le transfert des apoCs sur les HDL (Kinnunen et Ehnolm, 1976). Les recherches *in vitro* de Poensgen (Poensgen, 1990) montrent que l'apoC-I inactive la PLA_2 en bloquant son accès au substrat et protège ainsi les membranes biologiques contre les attaques de la phospholipase.

Plusieurs études suggèrent que l'apoC-I inhibe la clairance des VLDL contenant de l'apoE. En effet, l'apoC-I empêche la liaison des β-VLDL (VLDL riches en cholestérol apparaissant dans le plasma de lapins nourris d'une diète riche en cholestérol) à la LRP en déplaçant l'apoE de la surface de la β-VLDL (Weisgraber et al., 1990). D'autres études montrent que toutes les apoCs peuvent inhiber la captation et la dégradation des VLDL par la voie de la LRP; l'apoC-I étant l'inhibiteur le plus efficace (Kowal et al.,1990; Weisgraber et al.,1990). Les apoCs peuvent empêcher la dégradation des VLDL en masquant spécifiquement l'interaction de l'apoE au rLDL. Cet effet peut s'occasionner directement, par une association protéine-protéine, ou indirectement, en changeant les propriétés de surface de la VLDL, ce qui empêcherait cette dernière de s'associer au rLDL (Sehayek et Eisenberg, 1991).

1.2.4.3.2. Structure et gène

Le gène codant l'apoC-I humaine est situé sur le locus des gènes apoE/C-I/C-II au niveau du chromosome 19q13.2. Ce locus a une taille de 48 kpb (Li et al., 1988). Le gène d'apoC-I est constitué de 4,7 kpb et est localisé à 5 kpb en aval du gène de l'apoE dans la même orientation de transcription (Lauer et al., 1988). Il est principalement exprimé dans le foie, et en plus petites quantités dans les poumons, la peau, les testicules et la rate (Lauer et al., 1988). Une copie du gène de l'apoC-I, nommé pseudo-APOC-I', est localisée à 7,5 kpb en aval du gène APOC1 (Davison et al., 1986; Lauer et al., 1988). Le produit du gène APOC-1' n'a jamais été détecté. À 15 kpb du côté 3' du gène pseudo-APOC-I', est situé le gène de l'apoC-II, ce dernier étant constitué de 3,4 kbp (Smit et al., 1988).

L'expression des gènes d'apoC-I et d'apoE, est régulée par deux régions de contrôle hépatique (« hepatic control region », HCR) localisées à 17 et à 27 kbp en aval du gène APOE (Shachter et al., 1993; Simonet et al., 1993; Allan et al., 1995). Il a été démontré que la présence d'un seul de ces éléments est suffisante pour une expression significative de chacun des gènes du locus apoE/C-I/C-II au niveau du foie (Allan et al., 1997).

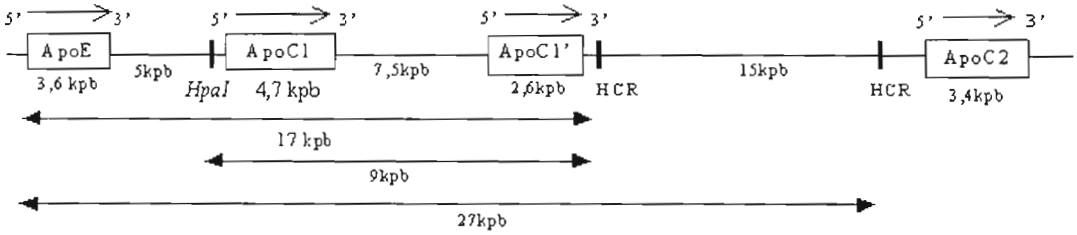


Figure 1. Structure du locus des gènes apoE/C-I/C-II.

La flèche représente le sens de la transcription. Figure adaptée de Lauer et al., 1988 ; Davison et al., 1986 ; Smit et al., 1988 ; Shachter et al., 1993; Simonet et al., 1993 ; Allan et al., 1995.

D'après l'équipe de Scott (Knott et al., 1984), l'apoC-I est synthétisée comme une préprotéine qui subit un clivage du peptide signal lors de sa translocation dans le réticulum endoplasmique rugueux. La protéine mature est de 57 résidus d'acides aminés et de masse moléculaire de 6,6 kDa. Il a été démontré que les résidus de 7 à 24 et de 35 à 53 représentent des structures amphiphiliques hélicoïdales importantes pour sa liaison aux lipoprotéines (Rozek et al., 1995).

Bien qu'à l'heure actuelle, les études menées sur l'apoC-I n'ont révélé aucun polymorphisme du gène entraînant des variants fonctionnels, un polymorphisme *HpaI* dans la région du promoteur a été décrit conduisant à une augmentation de l'expression du gène d'apoC-I de 57 % (Xu et al., 1999). Ce polymorphisme entraîne une augmentation du niveau de TG plasmatiques indépendamment du taux de cholestérol total (Hubacek et al., 2003). Ces résultats suggèrent qu'une surexpression d'apoC-I peut contribuer au développement de l'hyperlipidémie.

1.2.4.3.3. Souris transgéniques et « knock-out » en apoC-I

Afin d'élucider les fonctions *in vivo* d'apoC-I dans le métabolisme des lipoprotéines, plusieurs laboratoires ont créé des modèles de souris déficientes ou surexprimant le gène de l'apoC-I par des techniques de transgenèse et de criblage de gènes. Les souris transgéniques en apoC-I ont été générées en utilisant différentes constructions d'ADN, toutes contenant des éléments HCR pour diriger l'expression d'apoC-I dans le foie (Simonet et al., 1991; Jong et al., 1996a; Shachter et al., 1996).

Pour investiguer le mécanisme de l'hyperlipidémie chez des souris transgéniques en apoC-I, des études ont été réalisées avec des VLDL radiomarquées (Jong et al., 1996a; Shachter et al., 1996). Les résultats révèlent une forte diminution de la clairance des VLDL-TG et des VLDL-apoB. Des essais *in vitro* et *in vivo* de la lipolyse des VLDL-TG par la LPL démontrent que l'apoC-I n'interfère pas avec la lipolyse des VLDL. Les niveaux élevés de VLDL résultent donc d'une altération de la captation hépatique et non d'une augmentation de la synthèse ou d'une diminution du catabolisme (Jong et al., 1996a; Shachter et al., 1996).

L'étude de Jong et al. (1996b) montre qu'une surexpression de l'apoC-I humaine dans des souris transgéniques déficientes en rLDL entraîne une hyperlipidémie (par rapport aux souris uniquement déficientes en rLDL) induite par une inhibition d'une voie alternative de clairance des lipoprotéines. En effet, l'apoC-I inhibe la captation des lipoprotéines *in vivo* via la LRP, confirmant ainsi les recherches *in vitro* proposant l'apoC-I comme le plus efficace inhibiteur de la liaison des VLDL à la LRP (Weisgraber et al., 1990; Swaney et al., 1994).

Les recherches sur des souris apoC-I « knock-out » démontrent qu'elles sont hypolipidémiques lorsqu'elles suivent une diète normale. Par ailleurs, lorsqu'elles suivent plutôt une diète riche en cholestérol, les souris développent une hyperlipidémie (van Ree et al., 1995). Des expériences de liaison *in vitro* révèlent que les VLDL déficientes en apoC-I sont de faibles compétiteurs des LDL pour la liaison au rLDL (van Ree et al., 1995). D'autre

part, les études réalisées avec des souris déficientes en apoC-I montrent *in vivo* une inhibition de la captation des VLDL par la foie (Jong et al., 1997). Les auteurs proposent que l'absence totale d'apoC-I induit une diminution de la clairance des résidus des lipoprotéines médiée par les récepteurs.

En conclusion, la surexpression du gène humain d'apoC-I dans des souris transgéniques a pour effet d'inhiber la captation des particules de VLDL par le foie; le même effet peut être observé dans une moindre mesure en absence d'apoC-I. Les travaux de Jong et al. (1996a) suggèrent que l'apoC-I peut réprimer la clairance des VLDL soit directement, par une interaction spécifique avec le récepteur hépatique, soit de façon indirecte, en bloquant la liaison de l'apoE de la lipoprotéine au rLDL ou à la LRP. D'autre part, selon van Ree et al. (1995) et Jong et al. (1997), l'interaction atténuée entre les VLDL déficientes en apoC-I et les récepteurs hépatiques serait due à un enrichissement de la particule de VLDL en apoA-I et apoA-IV.

1.3. RÉCEPTEURS HÉPATIQUES IMPLIQUÉS DANS LE MÉTABOLISME DU CHOLESTÉROL

Dans la circulation sanguine, il est important de maintenir un équilibre lipidique. Le foie est le principal organe qui aide à préserver cet équilibre en éliminant le cholestérol véhiculé par les lipoprotéines et en le secrétant sous forme libre ou modifiée en acides biliaires (Dietschy et al., 1993). Plusieurs récepteurs impliqués dans le métabolisme des lipides ont été identifiés. Par contre, étant donné que le foie est l'organe-cible du métabolisme des LDL et des HDL, seuls les récepteurs hépatiques menant à la dégradation globale des LDL et à la captation sélective des EC liés aux LDL et aux HDL seront décrits.

1.3.1. Le récepteur des LDL (rLDL) : captation globale

Le récepteur des LDL est une glycoprotéine de 160 kDa responsable de la captation globale des LDL (Goldstein et Brown, 1973). Environ 70 % des rLDL sont exprimés au niveau du foie, le 30 % restant étant exprimé dans les glandes surrénales, les ovaires et d'autres tissus extra-hépatiques (Brown et Goldstein, 1983). Au niveau cellulaire ces récepteurs sont localisés dans des invaginations de la membrane plasmique tapissées de protéines appelées clathrines (Anderson et al., 1977; Pearse, 1976). Le rLDL est structuré en 5 régions distinctes : une région N-terminale qui constitue le site de liaison, une région homologue du précurseur de facteur de croissance épidermal (« epidermal growth factor » EGF), une région contenant des sucres O-liés, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal cytoplasmique. La région du site de liaison comprend 7 segments répétitifs riches en cystéines, stabilisés par trois ponts disulfure (Sudhof et al., 1985). Chaque segment répétitif contient dans sa partie C-terminale une séquence conservée en acides aminés qui interagit avec les résidus basiques de l'apoB_{100} et de l'apoE (Daniel et al., 1983). Le rLDL reconnaît les LDL via l'apoB_{100}, et les VLDL via l'apoE (Russell et al., 1989). La liaison des LDL au rLDL conduit à l'internalisation du complexe récepteur-ligand dans les endosomes et à l'interaction de ceux-ci avec les lysosomes. Parallèlement, le rLDL se dissocie de son ligand à l'intérieur des endosomes et retourne à la surface des cellules (Brown et al., 1997). Dans les lysosomes, les LDL sont dégradées en acides aminés et leurs EC sont hydrolysés en CL et en acides gras. Le CL libre intracellulaire inhibe l'expression du gène du rLDL (Brown et Goldstein, 1974) et régule à la baisse l'enzyme contrôlant la synthèse du cholestérol, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) (Saucier et al., 1989). À l'opposé, l'acyl-coenzyme A: cholestérol acyltransférase (ACAT) est activée (Goldstein et al., 1974) afin d'estérifier et d'emmagasiner le cholestérol non nécessaire à la structure ou la production cellulaire.

Plusieurs désordres génétiques du rLDL, telles l'hypercholestérolémie familiale humaine (HF) (Brown et Goldstein, 1986) et l'hyperlipidémie héréditaire Watanabe (WHHL) chez le

lapin (Bilheimer et al., 1982) provoquent une augmentation du niveau de LDL dans le sang. D'autre part, il a été estimé que chez des individus normaux, 42 % de la clairance des LDL passe par un autre récepteur que le rLDL (Dietschy et al., 1993). L'équipe de Madame Brissette (Izem et al., 1998) a démontré que l'inactivation du gène du rLDL entraîne une diminution de la dégradation de l'apoB des LDL, mais a peu d'effet sur l'association protéique et lipidique des LDL et sur l'activité des enzymes contrôlant l'homéostasie du cholestérol, la HMG-CoA réductase et l'ACAT. Elle proposa donc que la voie du rLDL soit importante pour la clairance de l'apoB des LDL et que le contrôle de l'homéostasie du cholestérol soit surtout attribué à une voie indépendante du rLDL.

Un autre récepteur hépatique de la famille des rLDL, impliqué dans la captation des résidus des chylomicrons, est la LRP. Elle est exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules animales, à la surface cellulaire et dans les vésicules intracellulaires (Herz et al., 1988). C'est une glycoprotéine composée de deux sous-unités liées de façon non covalente : la sous-unité α extracellulaire de 515 kDa, et la sous-unité β transmembranaire de 85 kDa (Herz et al., 1990). Il a été démontré que l'apoE favorise la liaison des lipoprotéines à la LRP (Kowal et al., 1990), tandis que l'apoC-I inhibe la liaison des β-VLDL à ce récepteur (Weisgraber, 1990).

1.3.2. Les récepteurs potentiels des HDL : captation globale

La littérature rapporte plusieurs récepteurs potentiels susceptibles de capter et dégrader les HDL (Fidge, 1999), toutefois, à ce jour aucune étude n'a pu démontré leurs rôles physiologiques, et en conséquence ils seront décrits succinctement.

La cubiline est une glycoprotéine membranaire de 460 kDa (Moestrup et al., 1998), sans domaines transmembranaire et cytoplasmique, qui interagit avec la mégaline comme co-récepteur. Elle est surtout exprimée dans le tubule proximal rénal et la vitelline (Sahali et al.,

1992), et au niveau cellulaire on la retrouve dans les lysosomes (Seetharam et al., 1997). Hammad et al., (1999) ont démontré que la cubiline médie l'endocytose et la dégradation lysosomale des HDL dans des cellules murines de l'endoderme de la vitelline, mais le mécanisme par lequel les HDL sont catabolisées reste inconnu.

La protéine liant les HDL (« high density lipoprotein binding protein », HBP) est une protéine ubiquitaire cytoplasmique de 110 kDa, qui peut s'attacher à la membrane plasmique et lier les HDL et l'apoA-I (Graham et Oram, 1987). La HBP n'a pas de domaine transmembranaire et est régulée par les hormones stéroïdiennes et le niveau de cholestérol cellulaire (Chiu et al., 1997). Son mécanisme de signalisation reste encore inconnu.

Tozuka et Fidge (1989) identifient une autre protéine membranaire capable de lier les HDL, nommée HB2. Elle est surtout exprimée dans le foie, le cerveau, l'intestin, les poumons et les macrophages (Matsumoto et al., 1997). Cette protéine de 100 kDa reconnaît les HDL, l'apoA-I et l'apoA-II (Tozuka et Figde, 1989), et est inhibée par les statines (Kurata et al., 1998) ou lorsque les cellules sont chargées de cholestérol (Matsumoto et al., 1997). La HB2 est caractérisée par la présence d'une queue cytoplasmique, un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine extracellulaire N- terminal possédant 8 sites de N-glycosylation.

1.3.3. La captation sélective et les récepteurs impliqués

Le phénomène de la captation sélective des EC suggère un transfert des EC du noyau hydrophobe de la lipoprotéine à la cellule hépatique, via les récepteurs, sans prise en charge définitive de la partie protéique. Ce phénomène est démontré lorsque la différence entre l'association des EC et celle des apolipoprotéines à la membrane plasmique donne une valeur positive nette. La voie de captation sélective a été étudiée bien des années avant la découverte des récepteurs impliqués. Pour expliquer la captation sélective des EC des HDL, le processus de rétroendocytose est d'abord proposé par l'équipe de Bierman et al. (1974) suite à des études sur des cultures de cellules de muscles lisses aortiques de rat. En 1990, l'équipe de

Nestel (Kambouris, et al., 1990) démontre que les cellules HepG2 peuvent lier, internaliser et secréter les HDL avec une certaine modification de leur composition.

1.3.3.1. Le récepteur « scavenger » de classe B type I (SR-BI)

Deux nomenclatures sont proposées pour le même récepteur : le SR-BI (Acton et al., 1994) chez les rongeurs et le « CD-36 LIMPII-analogous-1 » (CLA-1) chez l'humain (Calvo et Vega, 1993). Pour simplifier, la nomenclature SR-BI sera utilisée.

Le SR-BI est exprimé dans le foie et les organes stéroïdogéniques des rongeurs et des humains (Cao et al., 1997; Landschulz et al., 1996), ainsi que dans les cellules HepG2, un hépatome humain qui constitue un de nos modèles d'étude (Calvo et Vega, 1993). Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire de 80-88 kDa (Acton et al., 1996 ; Murao et al., 1997) constituée de 509 acides aminés (Calvo et Vega, 1993 ; Acton et al., 1994). La différence entre le poids moléculaire réel et le poids apparent s'explique par une forte glycosylation au niveau de son domaine extracellulaire (Babitt et al., 1997). Le SR-BI a la forme d'un U inversé comprenant deux domaines transmembranaires séparés par un large domaine extracellulaire. La structure de ce dernier domaine est inconnue, toutefois nous savons qu'il contient six résidus de cystéines (Calvo et Vega, 1993). Cette protéine a donc le potentiel de former des ponts disulfures dans son domaine extracellulaire. Le SR-BI possède des sites de palmytoylation sur les résidus d'acides aminés Cys^{462} et Cys^{470} dans la partie intracytoplasmique, permettant un meilleur ancrage à la membrane plasmique (Gu et al., 1998). De plus, l'analyse de l'ADNc du SR-BI prédit une protéine possédant des sites de phosphorylation par des protéines kinases sur les résidus Ser^{4}, Ser^{477} et Ser^{481}, tous dans la partie intracellulaire du récepteur (Calvo et Vega, 1993). Ces motifs suggèrent que la structure et la fonction du récepteur peuvent être modulées par phosphorylation de ses queues cytoplasmiques et par homo- ou hétérodimérisation. Le SR-BI peut lier avec une haute affinité les LDL oxydées (LDL-Ox), les LDL acétylées (LDL-Ac), l'albumine de sérum

bovin maléylée (BSA-M) (Acton et al., 1994), les LDL (Acton et al., 1994), les HDL (Acton et al., 1996), et les VLDL (Calvo et al., 1997).

Au niveau de la membrane cellulaire, le SR-BI est retrouvé concentré dans les cavéoles des cellules CHO (*Chinese hamster ovary*); les cavéoles étant des invaginations membranaires, riches en cholestérol libre et en glycosphingolipides, caractérisées par la présence de cavéoline-1 (Babitt et al., 1997). Différemment, des études utilisant des cellules HepG2 comme modèle ont plutôt montré un localisation dans les radeaux lipidiques qui sont des structures dénudées de cavéolines (Rhainds et al., 2004). Ainsi sa localisation membranaire dépendrait du type cellulaire qui l'exprime. Dans les hépatocytes murins, le SR-BI est localisé dans la membrane apicale et la membrane baso-latérale (Silver et al., 2001).

Le SR-BI est responsable du flux bidirectionnel du cholestérol, c'est-à-dire de la captation sélective des EC et de l'efflux de cholestérol cellulaire aux lipoprotéines de la circulation (Williams et al., 1999). Notamment notre groupe a démontré que dans des cellules HepG2, plus de 80 % de la captation sélective des EC des LDL et des HDL s'effectue par ce récepteur (Rhainds et al., 2003). Silver et ses collaborateurs (Silver et al., 2001) décrivent que la captation sélective des EC médiée par le SR-BI est liée à un processus de captation globale des HDL suivi d'une rétroendocytose. Les auteurs démontrent que le transfert de cholestérol des HDL aux hépatocytes polarisés via le SR-BI est accompagné d'un transport des particules dans un « endosomal recycling compartment » (ERC). Les HDL appauvries en lipides sont re-sécrétées vers le pôle basolatéral, tandis que le SR-BI et les lipides des HDL se dirigent vers le pôle apical (canalicule biliaire). Contrairement à cette conclusion, Nieland et ses coéquipiers (2005) suggèrent que l'endocytose n'est pas nécessaire pour la captation sélective des EC via la voie du SR-BI, ainsi le phénomène se déroulerait exclusivement à la membrane plasmique. Cependant des études de notre groupe (Rhainds et al., 2003) supportent aussi le principe de rétroendocytose.

Le SR-BI est considéré comme un facteur anti-athérogénique : les souris déficientes en SR-BI présentent des niveaux élevés en cholestérol sanguin (Rigotti et al., 1997). En effet, le SR-

BI participerait à la dernière étape du transport inverse du cholestérol. Ce transport implique l'enlèvement du cholestérol en excès des cellules extra-hépatiques par les HDL, l'estérification du cholestérol par la LCAT plasmatique, et son retour vers le foie par la voie de SR-BI pour une éventuelle excrétion dans la bile.

L'épissage alternatif de l'ARNm de SR-BI génère une autre isoforme, nommée SR-BII, qui a une région extracellulaire identique au SR-BI, mais diffère de celui-ci dans le domaine C-terminal cytoplasmique (Webb et al., 1998). Le SR-BII est exprimé dans le foie, les glandes surrénales et les testicules des rongeurs et des humains, ainsi que dans les cellules HepG2 (Webb et al., 1997). Son messager représente environ 20 % de l'ARNm total pour SR-BI/II dans les cellules HepG2 (Webb et al., 1998). Il a été démontré que l'estrogène stimule l'expression hépatique du SR-BII et inhibe l'expression du SR-BI (Graf et al., 2001). Le récepteur SR-BII reconnaît les HDL, et joue un rôle à la fois dans la captation et dans l'efflux de cholestérol cellulaire (Webb et al., 1998), toutefois à un moindre niveau que celui de SR-BI. D'autres investigations sont nécessaires pour comprendre les différences observées entre le SR-BI et le SR-BII.

1.3.3.2. Le « cluster of differentiation 36 » (CD36)

Des études ont démontré la présence d'un autre récepteur membre de la famille des récepteurs « scavenger » de classe B type I sur les cellules HepG2, le CD36 (Oquendo et al., 1989). Il est exprimé dans les microvillosités des cellules HepG2 (Maeno et al., 1994) et dans d'autres types cellulaires incluant les plaquettes, les adipocytes et les monocytes/macrophages (Oquendo et al., 1989; Harmon et Abumrad, 1993; Savill et al., 1992). C'est une glycoprotéine membranaire, de 78 à 88 kDa (Oquendo et al., 1989; Armesilla et Vega, 1994) comportant 471 résidus d'acides aminés (Armesilla et Vega, 1994). Tout comme le SR-BI, il possède deux domaines intracellulaires séparés par un large domaine extracellulaire (Armesilla et Vega, 1994). Il a été démontré que le CD36 lie les VLDL, les LDL et les HDL (Calvo et al., 1998). Le CD36 est aussi capable de médier l'association et la dégradation des LDL-Ox et des LDL-Ac (Endemann et al., 1993; Nozaki

et al., 1995). Des études menées sur des souris déficientes en CD36 ont révélé que celui-ci est le principal récepteur des LDL-Ox associées à la formation des cellules spumeuses (Kunjathoor et al., 2002), il est donc impliqué comme un facteur pro-athérogénique. Des recherches comparatives entre le CD36 et le SR-BI ont établi que le CD36 est capable de faire la captation sélective des EC des HDL, mais qu'il est 7 fois moins efficace que le SR-BI (Gu et al., 1998; Connelly et al., 1999). Toutefois, les études réalisées avec des cellules COS (cellules rénales de singe) sur-exprimant le SR-BI ou le CD36 montrent que les EC des LDL sont captés et hydrolysés aussi bien par le SR-BI que par le CD36 (Connelly et al., 2003). La participation du CD36 dans le métabolisme des lipoprotéines natives n'est pas bien définie.

1.4. BUT GÉNÉRAL DU PROJET ET INFORMATIONS PERTINENTES SUR LE MODÈLE UTILISÉ ET LA TECHNIQUE DE L'INTERFÉRENCE PAR L'ARN

Étant donné que le catabolisme des LDL et des HDL a lieu principalement dans le foie, le but de la présente étude était de définir l'effet de taux de sécrétion différents d'apoC-I par des cellules HepG2 sur le métabolisme de ces deux lipoprotéines. Les cellules HepG2 ont été transfectées avec un vecteur d'expression contenant l'ADNc de l'apoC-I humaine afin de produire une sur-expression du gène d'apoC-I. Les cellules sous-exprimant l'apoC-I sont générées par une technique d'interférence à l'ARN. Pour caractériser l'impact de l'apoC-I sur le métabolisme des LDL et des HDL, des essais ont été réalisés afin de déterminer les paramètres d'association, le ratio de captation sélective des esters de cholestérol et le taux de dégradation des apolipoprotéines des LDL et HDL_3, en vue de les comparer à ceux des cellules HepG2 non transfectées (cellules contrôles).

Le modèle cellulaire utilisé pour tester les différentes hypothèses de ce projet est la lignée de cellules d'un hépatome humain : HepG2. Celle-ci a été choisie à cause de sa proximité

physiologique avec les cellules parenchymenteuses du foie (Aden et al., 1979) et la facilité avec laquelle on les maintient en culture (Javitt, 1990). Le métabolisme des cellules HepG2 permet la synthèse du cholestérol par l'HMG-CoA réductase (Cohen et Griffioen, 1988), la β-oxydation des acides gras (Watkins et al., 1991) et la synthèse et la sécrétion dans le milieu plasmatique des différentes apolipoprotéines, parmi lesquelles l'apoC-I (Rash et al., 1981 ; Zannis et al., 1981). Les cellules HepG2 expriment des récepteurs pouvant lier et dégrader les LDL (Havekes et al., 1983), ainsi que les récepteurs SR-BI (Acton et al., 1994) et CD36 (Maeno et al., 1994).

L'interférence par l'ARN (« RNA interference », RNAi) a été d'abord découverte chez le nématode *Caenorhabditis elegans* en tant que phénomène capable d'inhiber l'expression génique. Le principe de cette inhibition repose sur un clivage, médié par des ARN double brin (ARNdb), de l'ARNm complémentaire (Fire et al., 1998 ; Montgomery et al., 1998). Selon l'hypothèse actuelle du mécanisme de l'ARNi, les longs ARN double brin (ARNdb), introduits dans les cellules de manière exogène ou endogène, sont clivés en courts fragments d'ARNdb appelés « short interfering RNA » (siRNA) de 21-25 nucléotides. La conversion d'ARNdb en siRNA est catalysée par une enzyme ARNase ATP-dépendante, nommée Dicer, qui a une forte affinité pour les molécules d'ARNdb (Zamore et al., 2000; Bernstein et al., 2001). Par conséquent, les siRNAs sont incorporés dans des complexes ribonucléoprotéiques, nommés RISC, « RNA-induced silencing complex » (Hammond et al., 2000), où les siARN servent de séquence-guide dirigeant le complexe vers l'ARNm cible (Martinez et al., 2002 ; Nykanen et al., 2001). L'ARNm, reconnu par le RICS, est clivé par une endonucléase présente dans le RICS (Liu et al., 2004 ; Martinez et Tuschl, 2004 ; Song et al., 2004). Plusieurs groupes ont eu recours à l'interférence par l'ARN afin d'inhiber l'expression de gènes cibles dans les cellules de mammifères. Récemment, Liao et Ning (2006) ont réussi à diminuer l'expression du gène d'apolipoprotéine B, de façon spécifique et permanente, dans des cellules HepG2 en utilisant un vecteur lentiviral exprimant des ARNdb en forme d'épingle à cheveux (« short hairpin RNA », shRNA).

1.5. HYPOTHÈSES QUI PRÉCÉDAIENT LE TRAVAIL

Plusieurs études ont démontré qu'une sur-expression d'apoC-I *in vivo* induit une diminution de la captation de lipoprotéines (VLDL) par la voie de la LRP (Weisgraber et al., 1990). D'autre part, Sehayek et Eisenberg (1991) ont montré que l'apoC-I inhibe la liaison des VLDL, médiée par l'apoE au rLDL, dans une culture de fibroblastes. En effet, dans ces essais, la plus forte inhibition des lipoprotéines au rLDL a été observée avec l'apoC-I, cette diminution étant due à une altération de la conformation d'apoE par l'apoC-I. Par ailleurs, l'apoC-I n'interfère pas dans la liaison, médiée par l'apoB, des lipoprotéines au rLDL (Clavey et al., 1995). Ainsi, dans le cas d'une sur-expression d'apoC-I dans des cellules HepG2, une inhibition de la captation des LDL était à prévoir, par une voie différente de celle du rLDL, à savoir via les récepteurs SR-BI et CD36. Dans cette hypothèse, une baisse de la captation sélective des EC des LDL était à considérer. Une sous-expression d'apoC-I pourrait, au contraire, stimuler *in vitro* la voie de captation sélective des EC des LDL par ces deux récepteurs.

En ce qui concerne les HDL_3, il a été démontré que l'apoC-I s'associe rapidement aux HDL dans le plasma (Malmendier et al., 1986). D'autre part, Xu et al. (1997) ont démontré que les structures hélicoïdales favorisent l'association au SR-BI. Ainsi, dans le contexte d'une sur-expression de l'apoC-I dans des cellules HepG2, et étant donné la présence d'hélices α-amphipatiques dans la structure de cette apo, une augmentation dans la captation sélective des EC des HDL_3 par le SR-BI était à considérer. Une réduction d'apoC-I secrétée dans le milieu, pourrait au contraire, diminuer l'affinité des HDL_3 pour le SR-BI et par conséquent, baisser la captation sélective des EC de ces lipoprotéines par ce dernier.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. MATÉRIEL

La lignée cellulaire d'hépatome humain, HepG2, est obtenue de American Type Culture Collection (Rockville, Maryland). L'apoC-I purifiée provient de Calbiochem (La Jolla, Californie). Le milieu essentiel minimal (MEM), le sérum de veau fœtal, la pénicilline-streptomycine utilisés pour la culture cellulaire sont achetés chez Life Technologies Gibco BRL (Burlington, Ontario). La généticine provient d'Invitrogen (Carlsbad, Californie) ainsi que le vecteur d'expression eucaryote pcDNA 3.1 (-). L'iode-125 (^{125}I) (100 mCi/mmol) et le 1,2-^{3}H-cholestérol oléate (50 mCi/mmol) sont acquis respectivement d'ICN Canada (Montréal, Québec) et d'Amersham Pharmacia Biotech (Laval, Québec).

2.1.1. Culture cellulaire

Tel que décrit par Leblond et Marcel (1991), les cellules HepG2 sont maintenues dans un incubateur à 37° C en atmosphère humide, avec 95 % d'air et 5 % de CO2, dans des flacons de 75 cm² contenant 14 ml de MEM, supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), de pénicilline (100 unités/ml), de streptomycinc (100 mg/ml), et de glutamine (4 mM). Ce milieu, appelé milieu complet (MC), est changé tous les 2-3 jours, et de nouvelles cellules pour la culture sont propagées tous les 7 jours. Cinq jours avant chaque expérience, $3,0x10^{5}$

cellules par puits sont mises dans des plaques de culture cellulaire de 3,8 cm^2 (12 puits). Enfin, les essais sont effectués lorsque les cellules atteignent 90-100 % de confluence.

2.1.2. Préparation des lipoprotéines

Le plasma humain de sujets normolipidémiques est supplémenté de 0,01 % d'éthylènediamine tétraacétate (EDTA), de 0,02 % d'azoture de sodium (NaN_3) et de 10 µM de fluorure de phénylméthylsulphonyl (PMSF) avant l'isolement des lipoprotéines selon la méthode de Hatch et Lees (1968) légèrement modifiée par Brissette et Noël (1986). Toutes les ultracentrifugations se déroulent à 16° C. Pour isoler les LDL, de densité variant entre 1,025 et 1,063 g/ml, la densité du plasma est d'abord amenée à 1,025 g/ml par l'ajout de bromure de sodium (NaBr), puis le plasma est centrifugé à $2,3x10^6$ g pendant 16 heures. Le sousnageant, contenant les LDL, est récupéré et réajusté à 1,063 g/ml par du NaBr, puis centrifugé à $2,3x10^6$ g pendant 16 heures. Les LDL, de densité comprises entre 1,025 et 1,063 g/ml, ayant migrées vers le haut du tube sont reprises afin d'être lavées à une densité de 1,063 g/ml par une dernière centrifugation aux mêmes conditions. Les HDL_3, de densité variant entre 1,125 et 1,210 g/ml, sont obtenues par ajustement de la densité du plasma humain à 1,125 g/ml, suivi d'une ultracentrifugation à $3x10^6$ g pendant 22 heures. La phase inférieure est récupérée, puis réajustée à 1,21 g/ml afin de poursuivre par une ultracentrifugation à $4,6x10^6$ g pendant 22 heures. Les HDL_3 se trouvant alors dans le surnageant, sont lavées par ultracentrifugation. Enfin, les LDL et les HDL_3 sont dialysées dans du tampon salin (TBS) (10 mM Tris à pH 7,4 contenant 150 mM en NaCl et 0,02% en NaN_3) pour éliminer l'excès de sel dans la solution.

2.1.3. Marquage radioactif des lipoprotéines

Les LDL et les HDL_3 sont marquées à l'iode dans leur partie protéique par une modification (Langer et al., 1972) de la méthode de McFarlane (1958) utilisant du monochlorure d'iode. Un millicurie de $Na^{125}I$ est utilisé pour marquer 2,5 mg de lipoprotéines en présence de 30

nmoles (10 nmoles pour les HDL_3) de monochlorure d'iode dans 0,5 M glycine-NaOH (pH 10). L'iode libre est éliminé par filtration moléculaire sur gel de Séphadex G-25, suivi d'une dialyse dans du TBS. L'activité spécifique se situe généralement entre 100 000 et 250 000 cpm/µg de protéines. Les LDL et les HDL_3 sont marquées au ^{3}H-cholesteryl oleate (EC) selon la méthode décrite par Roberts et al. (1985). Sommairement, 25µCi d'^{3}H-EC sont évaporés sous azote et resuspendus dans 250 µl d'acétone. À ce volume d'acétone sont ajoutés 3 ml de sérum délipidé, contenant de la CETP. L'acétone est ensuite évaporée sous azote. Les LDL ou les HDL_3 (1 ml), à une concentration de 1 mg/ml, sont ajoutées au sérum contenant les ^{3}H-EC, puis incubées pendant 30 minutes à 4° C avant de les centrifuger pour les isoler comme décrit ci-haut. L'activité spécifique des lipoprotéines marquées aux ^{3}H-EC varie habituellement entre 5 800 et 11 900 cpm/µg de protéines.

2.1.4. Obtention de transformants stables et transitoires exprimant différents niveaux d'apoC-I

2.1.4.1. Cellules HepG2 sur-exprimant l'ADNc de l'apoC-I (transfection stable)

2.1.4.1.1. Synthèse de l'ADNc de l'apoC-I par RT-PCR à partir de cellules HepG2 et digestion du vecteur pcDNA 3.1(-).

L'ARN total de cellules HepG2 atteignant une confluence de 80-90 % est extrait avec du Trizol® et du chloroforme (5 : 1). Le mélange ainsi obtenu est centrifugé à 11 500 rpm pendant 15 minutes à 4° C. La phase aqueuse est récupérée et l'ARN est précipité avec de l'isopropanol. Après une deuxième centrifugation à 11 500 rpm pendant 10 minutes à 4° C, le sédiment obtenu contenant l'ARN est lavé avec de l'éthanol 70 %, puis dissout dans de l'eau sans RNases. Afin de synthétiser de l'ADNc, un mélange réactionnel est préparé contenant 2 µg d'ARN total, 0,5 mM de chaque dNTP (désoxy nucléotide tri-phosphate), 1 µM d'amorces « oligo-dT », 10 unités enzymatiques d'inhibiteur de RNases et 4 unités

enzymatiques de la transcriptase inverse Omniscript, le tout dans un tampon de transcriptase inverse. Ce mélange est incubé 1 heure à 37° C. Par la suite, l'ADNc de l'apoC-I est amplifié par PCR à partir de l'ADNc total en utilisant des amorces spécifiques du gène de l'apoC-I, comportant de plus des sites des enzymes de restriction *XhoI* et *HindIII*, du côté 5'et 3' du gène respectivement. Les résultats de la RT-PCR sont contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

amorce sens : 5' gccctcgagcc(atg)aggctcttcctgt 3'
XhoI

amorce antisens : 5' gtcaagcttcaggtcc[tca]tgagtcaatc 3'
HindIII

Figure 2. Représentation schématique des amorces sens et antisens du gène de l'apoC-I, utilisées pour réaliser la RT-PCR à partir d'un pool de l'ARNm de cellules HepG2.

Les séquences soulignées indiquent les sites des enzymes de restriction. Les nucléotides entre parenthèses et crochets indiquent le codon d'initiation de la transcription et le codon d'arrêt respectivement.

Enfin, le produit de la RT-PCR, contenant l'ADNc de l'apoC-I et le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.1(-) sont digérés séparément avec les enzymes de restriction *XhoI* et *HindIII*. Ces digestions sont réalisées avec 0,1 µg/µl d'ADN et 5 unités enzymatiques par µg d'ADN pour chacune des 2 endonucléases, le tout dans un tampon de restriction « NEBuffer 2 » de New England Biolabs, à une concentration finale de 1X. Les préparations sont incubées pendant 2 heures à 37° C, puis analysées par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. Les bandes sont excisées du gel, puis éluées par la méthode du QIAquick Spin Gel Extraction Kit (Qiagen) qui consiste à faire fondre l'agarose dans un tampon contentant un indicateur de pH, afin de s'assurer d'une bonne absorption de l'ADN sur la membrane. Celle-

ci est lavée par du tampon contenant de l'éthanol, ce qui permet l'élution de l'ADN grâce à une solution basique de faible concentration en sel.

2.1.4.1.2. Ligation et transformation bactérienne.

L'ADNc de l'apoC-I est lié à l'ADN plasmidique du vecteur pcDNA 3.1(-) selon le ratio 1:5 (plasmide : ADNc) par la ligase du phage T4, pendant toute une nuit à 4° C, en vue d'une transformation dans des bactéries compétentes *Escherichia Coli* DH5α. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées sur un milieu d'agar contentant 20 µg/ml d'ampicilline comme marqueur de sélection. Les colonies sélectionnées sont d'abord amplifiées en petite quantité, et la présence de l'insert au niveau du vecteur est vérifiée par digestion enzymatique avec les endonucléases *HindIII* et *NdeI*. Puisque l'enzyme *NdeI* coupe à 470 bp en amont du site de restriction *XhoI*, elle devait produire deux fragments, dont un de 770 pb en présence d'insert. Les clones sélectionnés sont ensuite produits en grande quantité (maxipréparation) et l'ADN est extrait au phénol/chloroforme. Afin de confirmer la séquence de l'insert, l'ADN des clones sélectionnés est séquencé par un service offert à l'Université McGill.

2.1.4.1.3. Transfection du vecteur pcDNA3.1(-)/ADNc de l'apoC-I dans des cellules HepG2.

En premier lieu, les cellules doivent être préparées de telle sorte qu'elles soient à une confluence de 50 à 80 % le jour de la transfection. L'agent de transfection GeneJuice® (Novagen) et l'ADN du vecteur recombinant, dans un ratio 1µl de GeneJuice® pour 6 µg d'ADN, sont mélangés dans un milieu sans sérum OPTI-MEM (Invitrogen) et sont incubés 5 minutes à la température ambiante, avant d'être ajoutés aux cellules. Après deux heures d'incubation, le milieu de transfection est changé et les cellules sont mises en présence de l'antibiotique de sélection, la généticine, à une concentration de 700 µg/ml. La durée de sélection est d'environ trois semaines. À la fin de la sélection, les clones sont isolés puis mis en culture séparément.

2.1.4.2. Cellules HepG2 sous-exprimant l'ADNc de l'apoC-I (transfection transitoire)

2.1.4.2.1. Sélection de siRNA susceptibles d'inhiber l'expression du gène de l'apoC-I.

Afin d'inhiber l'expression du gène d'apoC-I par le technique d'ARNi, une présélection de siRNA susceptibles d'interférer avec l'ARNm du gène cible est effectuée. Plusieurs caractéristiques des siRNA doivent être prises en compte pour promouvoir une inhibition efficace. Raynolds et al., (2004) ont défini huit critères pour avoir une fonctionnalité des siRNA, parmi lesquels trois critères thermodynamiques : un contenu faible en G/C, une faible stabilité interne du côté 3' (5' antisens), et un manque de répétitions internes. Les déterminants relatifs à la séquence du brin sens sont : une adénine en position 3 et 19, une uracile en position 10, et l'absence de guanine et cytosine en position 19. Enfin, pour s'assurer de la spécificité des siRNA sur la séquence cible, un alignement de séquences est effectué par le programme BLASTn. Les siRNA présélectionnés sont testés pour leur capacité à induire l'inhibition de l'expression d'apoC-I en effectuant des transfections transitoires dans des cellules HepG2.

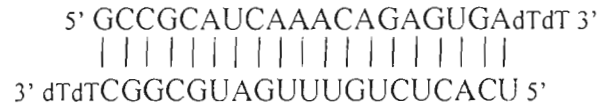


Figure 3. Représentation schématique d'un duplex d'amorces de siRNA dirigé contre l'ARNm d'apoC-I.

2.1.4.2.2. Transfection de siRNA dirigés contre l'ARNm de l'apoC-I dans des cellules HepG2.

Le jour de la transfection les cellules doivent être à une confluence de 40 à 50 %. Les siRNA dirigés contre l'ARNm de l'apoC-I ou les siRNA non spécifiques (contrôle négatif) sont dilués dans 100 µl de milieu sans sérum afin d'obtenir une concentration finale de siRNA de 5 nM. L'agent de transfection HiPerfect® (Qiagen) et les siRNA, dans un ratio 6 µl de HiPerfect® pour 37,5 ng de siRNA, sont mélangés et incubés pendant 5 minutes à la température ambiante pour permettre la formation de complexes. Le mélange est ajouté goutte à goutte aux cellules HepG2 mises en contact avec 1 ml de milieu MEM sans sérum de bœuf fœtal, et les cellules sont incubées pendant 24 heures à 37° C. Après cette période d'incubation, une deuxième transfection est réalisée, et les cellules sont de nouveau incubées à 37° C. Les essais d'association et de dégradation des lipoprotéines aux cellules transfectées avec des siRNA ont lieu le lendemain de la deuxième transfection.

2.2. MÉTHODES

2.2.1. Mesure du niveau d'expression de la protéine apoC-I sécrétée par ELISA « Enzyme linked immunosorbent assay » non compétitif

La méthode a été développée par le laboratoire de Monsieur Cohn (1996) d'après celle de Bury et al. (1986). L'anticorps polyclonal anti-apoC-I de chèvre (Biodesign International) est ulilisé à la fois comme un anticorps de capture et un anticorps de détection. Avant chaque essai, les puits des microplaques sont lavés trois fois avec du tampon sodium phosphate (PBS1) à 10 mM et à pH 7,4 (10 mM/l de sodium phosphate, 0,15 mol/l NaCl, 1 mg/ml NaN_3) contenant 0,5 ml/l de Tween-20. Les sites de liaison non spécifique sont bloqués

pendant une heure à la température de la pièce avec, par puits, 200 µl de PBS1 contenant 0,1 % de caséine et 0,01 % de merthiolate.

Après une incubation des cellules HepG2 et des cellules exprimant différents niveaux d'apoC-I dans un milieu MEM sans sérum de bœuf fœtal (celui-ci contenant de l'apoC-I bovine) pendant 48 heures à 37° C, les protéines secrétées dans le milieu extracellulaire sont récupérées. Le milieu est dilué à 1 :1000 puis ajouté aux microplaques pré-recouvertes de l'anticorps dirigé contre l'apoC-I (1,1 µg/puits) dilué dans du PBS1 à pH 7,4. La dernière rangée de la microplaque n'est pas recouverte d'anticorps puisqu'elle sert à déterminer l'association aux puits sans recouvrement. Après une incubation pendant la nuit à 37° C sur une plaque agitatrice, le milieu des microplaques est aspiré et les microplaques sont lavées six fois avec du PBS1 contentant 0,5 ml/l de Tween-20. L'anticorps polyclonal anti-apoC-I de chèvre conjugué à la péroxydase (0,08 µg) est ajouté à chaque puits. Les microplaques sont incubées pendant 3 heures à 37° C sur une plaque agitatrice. Le milieu des microplaques est absorbé et les plaques sont lavées six fois avec du PBS1 contentant 0,5 ml/l de Tween-20. Un aliquot (100 µl) du substrat *o*-phénylenediamine hydrochlorure (2,4 g/l) est ajouté aux puits pour permettre le développement de la couleur. Après 30 minutes, la réaction est arrêtée en ajoutant de l'acide sulfurique (100 µl) à 2,5 M. L'absorbance est lue à 490 nm sur un « Powerwave X de Bio-Tek ».

Une courbe étalon (variant de 0,5 ng à 10 ng) est établie pour chaque essai en préparant des dilutions appropriées d'un standard d'apoC-I plasmatique. La courbe standard est obtenue en lisant l'absorbance à 490 nm de chacune des concentrations du standard (100 µl). Les mesures d'étalon sont analysées par régression non linéaire (courbe polynomiale de seconde ordre) à l'aide du logiciel Sigma-plot et les valeurs d'absorbance sont transformées en concentration par analyse de régression.

2.2.2. Essais d'association et de dégradation

Les essais d'association/dégradation nécessitent une confluence cellulaire d'environ 90-100%. Dans tous les cas, la monocouche cellulaire est d'abord lavée deux fois avec 1 ml de PBS2 (20 mM de PO_4 à pH 7,4 contenant 0,02 % (p/v) de KCl et 0,08 % (p/v) de NaCl). Par la suite, les essais d'association/dégradation sont effectués soit avec des cellules HepG2 en présence de 0; 2,5 ou 5 µg/ml d'apoC-I exogène (concernant les essais avec l'apoC-I exogène), soit avec les constructions cellulaires sur- et sous-exprimant l'apoC-I (concernant les essais avec l'apoC-I endogène), incubées en présence de 20 µg/ml de lipoprotéines marquées à l'iode-125 ([^{125}I]-LDL et [^{125}I]-HDL_3) ou de lipoprotéines marquées au tritium ([^{3}H]EC-LDL et [^{3}H]EC- HDL_3) dans 125 µl de MEM supplémenté de 4 % (p/v) d'albumine de sérum bovin (BSA), à un pH de 7,4 dans un volume total de 250 µl, et ce sur une période de 4 heures à une température de 37° C. L'association non spécifique est déterminée par l'ajout de 1,5 mg/ml de la lipoprotéine appropriée non marquée. À la fin de l'incubation, les cellules sont lavées avec 1 ml de PSB2 contenant 0,2 % (p/v) de BSA (PBS-BSA), puis une autre fois avec du PBS2. Les cellules sont ensuite solubilisées dans une solution de 0,1 N de NaOH (1,5 ml). La radioactivité gamma (association en [^{125}I]) est déterminée par un compteur gamma (Compteur Cobra II), alors que la radioactivité béta (association en [^{3}H]EC) est déterminée à l'aide d'un compteur béta (Wallach-Fischer). La quantité de protéines cellulaires est déterminée par un dosage protéique. L'association des lipoprotéines marquées en [^{125}I] et marquées en [^{3}H] est exprimée en µg de protéines par mg de protéines cellulaires pour permettre la comparaison. La différence entre l'association lipidique et l'association protéique (association EC – association protéine) permet d'évaluer le taux de captation sélective.

L'estimation de la dégradation des protéines demande la récupération des milieux dans lesquels les cellules ont été incubées précédemment. Les puits sont ensuite lavés avec 250 µl de tampon PBS2-BSA. Pour chaque échantillon, 0,1 volume de BSA à 10 % et 500 µl de TCA (acide trichloracétique) à 24 % (p/v) sont ajoutés. Suite à une incubation de 30 minutes

à 4° C, une centrifugation de 15 minutes à 2200 g est effectuée. Le surnageant, contenant les peptides marqués en [^{125}I] rejetés par la cellule (signe de la dégradation) et l'iode radioactif libre (contaminant non désirable) est récupéré. Pour éliminer l'iode libre résiduelle, 10 µl d'une solution de KCl à 40 % (p/v) et 40 µl d'une solution de H_2O_2 à 30 % sont ajoutés au surnageant. Après 5 minutes d'incubation à la température de la pièce, 2 ml de $CHCl_3$ sont additionnés à la préparation. Les petits peptides marqués à l'iode, issus de la dégradation des protéines, sont ainsi isolés et comptabilisés par un compte au compteur gamma.

2.2.3. Essais d'association et de dégradation avec du milieu MEM enrichi en apoC-I

Afin de déterminer si un milieu MEM enrichi en apoC-I peut avoir un impact sur l'association et la dégradation des lipoprotéines, d'autres protocoles d'essais d'association et de dégradation ont été proposés. Dans un premier temps, les cellules sur-exprimant l'apoC-I et les cellules HepG2 sont mises en contact avec du milieu MEM sans sérum de bœuf fœtal pendant 48 heures à 37° C. Ces deux types de milieux sont ensuite récupérés et utilisés dans les essais d'association et de dégradation de lipoprotéines sur des cellules HepG2, décrits ci-dessus. Dans un deuxième type d'essai, ces deux types de milieux MEM sont incubés en présence de 20 µg/ml de lipoprotéines marquées à l'iode-125 ([^{125}I]-LDL et [^{125}I]-HDL_3) ou de lipoprotéines marquées au tritium ([^{3}H]EC-LDL et [^{3}H]EC- HDL_3) dans un volume total de 300 µl par puits, et ce sur une période de 16 heures à une température de 37° C. L'association non spécifique est déterminée par l'ajout de 1,5 mg/ml de la lipoprotéine appropriée non marquée. A la fin de l'incubation, les différents milieux contenant les lipoprotéines sont mis en contact avec des cellules HepG2 pendant 4 heures à 37° C pour analyser l'association et la dégradation des lipoprotéines aux cellules.

Enfin, une autre manière d'enrichir le milieu extracellulaire en apoC-I est de pré-incuber les cellules sur-exprimant l'apoC-I et les cellules transfectées avec le vecteur vide avec 300 µl par puits de milieu MEM sans sérum de bœuf fœtal pendant 16 heures à 37° C. Après cette période d'incubation, le milieu est supplémenté de 4 % (p/v) de BSA à un pH de 7,4 et les

cellules sont mises en présence de 20 µg/ml de lipoprotéines marquées à l'iode-125 ([^{125}I]-LDL et [^{125}I]-HDL_3) ou de lipoprotéines marquées au tritium ([^{3}H]EC-LDL et [^{3}H]EC-HDL_3), pendant 4 heures à 37° C. L'association non spécifique étant déterminée par l'ajout de 1,5 mg/ml de la lipoprotéine appropriée non marquée.

2.2.4. Mesure du niveau d'expression des récepteurs SR-BI, rLDL et CD36

Les protéines cellulaires sont obtenues par la méthode de Yoshimura et al., (1987) décrite ci-dessous. La monocouche cellulaire est lavée deux fois avec du PBS2 avant d'être solubilisée dans un détergeant hypotonique (125 mM Tris-HCl à pH 8,0 contentant 0,2 mM de $CaCl_2$, 1,4 % de triton X-100 (v/v), 1 mM de PMSF, 1 µM de leupeptin, 10 mg/ml d'aprotinine et 200 µM de pepstatine). L'homogénat de cellules est ensuite centrifugé à 13 000 g pendant 25 minutes à 4° C et le surnageant protéique est récupéré. La concentration protéique est déterminé par la méthode de Lowry et al. (1951). Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 8 %, contentant du β-mercaptoéthanol et du sodium dodécyl sulfate (SDS) (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose selon la méthode de Burnette (1981). Pour une détection spécifique du SR-BI et du rLDL les membranes sont incubées pendant 1h30 à 37° C sous agitation avec un anticorps polyclonal anti-SR-BI dilué à 1 :5000 (pAb anti-SR-BI NB 400-101) ou un anticorps anti-rLDL dilué à 1 :500 (RDI PRO6 1099) dans du TBS-T (20 mM Tris à pH 7,6 contenant 137 mM en NaCl et 0,1 % Tween-20) contentant 1 % BSA et 0,5 % NaN_3. Pour détecter spécifiquement le CD36, les membranes sont mises en contact pendant la nuit à 4° C sous agitation avec un anticorps anti-CD36 (pAb anti-CD36 400-145) dilué à 1 :1000 dans du TBS-T, contenant 1 % BSA et 0,5 % NaN_3. Après l'incubation, elles sont lavées trois fois avec du TBS-T à 37° C (SR-BI ou rLDL) ou à la température de la pièce (CD36) sous agitation pendant 5 minutes. Les membranes sont ensuite mises en contact pendant 1h30 à 37° C (SR-BI ou rLDL) ou pendant 1h30 à la température ambiante (CD36) sous agitation avec un anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase dilué à 1 : 5000

(SR-BI) ou à 1 : 2500 (rLDL) ou à 1 :10 000 (CD36) dans du TBS-T contenant 5 % lait. Elles sont révélées par chemiluminescence sur film photosensible Kodak (Biomax ML).

2.2.5. Clairance des LDL et des HDL_3 en présence de l'apoC-I purifiée

2.2.5.1. Injection in vivo des lipoprotéines avec de l'apoC-I purifiée

Pour élucider le rôle de l'apoC-I dans le métabolisme des LDL et les HDL_3 *in vivo*, la clairance plasmatique des lipoprotéines marquées à l'iode-125 ($[^{125}I]$-HDL_3) ou au tritium-éther ($[^3H]$ECt-LDL et $[^3H]$ECt- HDL_3) est étudiée chez des souris normolipidiques C57BL6. Il faut mentionner que pour ces études, l'éther de cholestérol tritié et non l'ester de cholestérol tritié est utilisé pour marquer les lipoprotéines puisque sur une longue période de temps, les esters de cholestérol tritiés sont hydrolysés par les cellules les ayant captés et peuvent retournés à la circulation sous forme de cholestérol libre tritié. Les éthers de cholestérol ne pouvant subir cette hydrolyse lysosomiale, ils restent dans les lysosomes et ne peuvent constituer une nouvelle source de cholestérol plasmatique. Ils permettent donc d'obtenir une valeur vraie de ce qui a été capté par les cellules.

Après une nuit de jeûne, les souris reçoivent une injection intraveineuse de 20 µg de lipoprotéines marquées à l'iode-125 ou au tritium-éther et un bolus de 480 µg de lipoprotéines non marquées, le tout additionné de 0 ou 50 µg de l'apoC-I purifiée. Les prélèvements sanguins sont récoltés à 2, 5, 10, 20, 30, 60 minutes et à 1, 3, 6 et 24 heures après l'injection afin d'observer la clairance des LDL et des HDL_3.

2.2.5.2. Analyse plasmatique des lipoprotéines marquées

Les échantillons sanguins sont centrifugés pendant 4 minutes à 12 000 rpm à 4° C afin d'éliminer les globules rouges. Le plasma (surnageant) contenant les lipoprotéines marquées

à l'iode-125 est récupéré, et 15 µl de chaque échantillon sont transférés dans un tube Eppendorf complétés avec 125 µl de BSA à 2 %. Les protéines sont précipitées avec 125 µl de TCA à 30 %, le mélange est incubé à 4° C pendant une heure, puis centrifugé à 4 500 rpm pendant 10 minutes à 4° C. Le culot obtenu est solubilisé avec 750 µl de NaOH à 0,2 M. La radioactivité γ est ensuite comptée par un compteur Cobra II. En ce qui concerne le plasma contenant les lipoprotéines marquées au tritium-éther, la radioactivité β est directement comptée par scintillation dans un compteur Wallach-Fischer.

Les courbes de clairance des lipoprotéines sont établies à partir des mesures de la radioactivité β ou γ. Elles sont représentées en pourcentage de la radioactivité restante en circulation sur la radioactivité injectée initialement, en fonction du temps.

2.2.5.3. Mesure de la radioactivité associée aux éthers de cholestérol tritiés dans le foie, les intestins et l'estomac

Les souris sont sacrifiées après la dernière prise de sang, et le foie, les intestins et l'estomac sont prélevés. La radioactivité γ des organes récoltés contenant les lipoprotéines marquées à l'iode est comptée directement à l'aide du compteur Cobra II. Pour les mesures de la radioactivité β, les organes sont broyés au polytron PT 3000 (Brinkmann Instruments) jusqu'à l'homogénéisation. Un aliquot de chaque organe (250 µl) est mélangé avec 2 ml de Soluene 350® (Perkin Elmer), et incubé à 60° C pendant 4 heures. Par la suite, chaque échantillon de tissu est aliquoté en 100 µl, auxquels sont ajoutés 200 µl de H_2O_2 à 30 %. Après une incubation de 30 minutes à 55° C, 15 ml de Hionic-Flour® (Perkin Elmer) sont additionnés et les préparations sont comptées au compteur β. Toutes les valeurs sont ajustées par rapport au pourcentage de lipoprotéines radioactives injectées au départ.

2.2.6. Analyse de liaison de l'apoC-I purifiée aux cellules HepG2 et aux lipoprotéines

2.2.6.1. Marquage radioactif de l'apoC-I purifiée

Puisque l'apoC-I ne possède pas de résidus tyrosine, son marquage à l'iode-125 est obtenu par conjugaison de la protéine avec le réactif de Bolton et Hunter (N-succinimidyl 3-(4-hydroxy,[5-^{125}I] iodophényl) propionate) (Perkin Elmer). Un millicurie du réactif de Bolton et Hunter est utilisé pour marquer 120 µg d'apoC-I purifiée resuspendue dans un tampon sodium borate à 0.1 M et à pH 8.5. Le mélange réactionnel est agité pendant 15 minutes à 0° C. Ainsi 0,4-0,5 mole de l'^{125}I-ester réagit avec 2 moles d'apoC-I. La réaction de conjugaison est arrêtée par l'ajout de 500 µl de glycine à 0.2 M pendant 5 minutes à 0° C. Le réactif de Bolton et Hunter est éliminé par dialyse dans du TBS à l'aide d'une cassette Slide-A-Lyser® (Thermo scientific). L'efficacité du marquage est de 27,5 % et l'activité spécifique de [^{125}I]-apoC-I est de 2 537 000 cpm/ µg de protéines.

2.2.6.2. Essais de liaison de l'apoC-I aux cellules HepG2

Les cellules HepG2, ensemencées dans des plaques de 24 puits, sont d'abord lavées deux fois avec 1 ml de PBS2. Les cellules sont ensuite incubées pendant 2 heures à 4° C en présence de concentrations croissantes en [^{125}I]-apoC-I (de 1 à 20 µg/ml) dans un volume total de 125 µl contenant 62,5 µl de MEM supplémenté de 2 % (p/v) de BSA et de 25 mM de Hepes à pH 7.4 (liaison totale). La liaison non spécifique est déterminée en ajoutant de l'apoC-I non marquée à des concentrations 20 fois supérieures à celles utilisées pour définir la liaison totale. À la fin de l'incubation, la monocouche cellulaire est lavée une fois avec 1 ml de PBS2 contenant 0,2 % (p/v) de BSA, puis deux fois avec 1 ml de PBS2. Les cellules sont ensuite solubilisées avec 750 µl de NaOH 0.1 N, puis dosées pour leurs contenus en protéines et comptées pour la radioactivité γ à l'aide du compteur Cobra II. La liaison spécifique est calculée en soustrayant la liaison non spécifique de l'apoC-I marquée à l'iode de la liaison

totale. Les courbes obtenues à partir des données de la liaison spécifique sont transformées en graphique selon la méthode de Scatchard (1949). La constante de dissociation (K_d) est calculée à partir de la pente, et la liaison maximale (B_{max}) est obtenue par interception de la droite avec l'axe des *x*.

2.2.6.3. Essais d'association de l'apoC-I aux LDL et aux HDL_3

Pour vérifier si l'apoC-I purifiée peut s'associer aux lipoprotéines, l'[^{125}I]-apoC-I (2,5 µg/ml) est incubée en présence de LDL ou de HDL_3 non marquées (20 µg/ml) dans un volume total de MEM de 1 ml pour une durée de 4 heures et à une température de 37° C. À la fin de l'incubation, le milieu est centrifugé dans des tubes Amicon Ultra-15® (Millipore) pendant 15 minutes à 4° C. L'éluât, contenant l'[^{125}I]-apoC-I libre est enlevé, et les lipoprotéines retenues dans le réservoir sont comptées pour la radioactivité γ. Vingt cinq milles cpm de chaque milieu d'incubation et 5 000 cpm de [^{125}I]-LDL et de [^{125}I]-HDL_3 sont mis sur un gel d'électrophorèse de gradient non dénaturant (« Nondenaturing gradient gel electrophoresis » NDGGE) (VWR). Les échantillons subissent une migration électrophorétique suivant le schéma de voltage suivant : 20V pendant 15 minutes, 70V pendant 20 minutes et 125V pendant 2 heures. Le gel est ensuite solidifié durant 30 minutes dans une solution contenant 10 % d'acide acétique, 50 % de méthanol et 3 % de glycérol. Il est alors séché pendant 45 minutes à 75 °C et exposé sur film Kodak pendant 15 heures à – 80° C.

2.2.7. Autres méthodes

Les concentrations en protéines des différents milieux analysés sont déterminées par la méthode de Lowry et al. (1951) ayant comme standard la BSA. La validité des résultats sera évaluée statistiquement par un test *t* de Student.

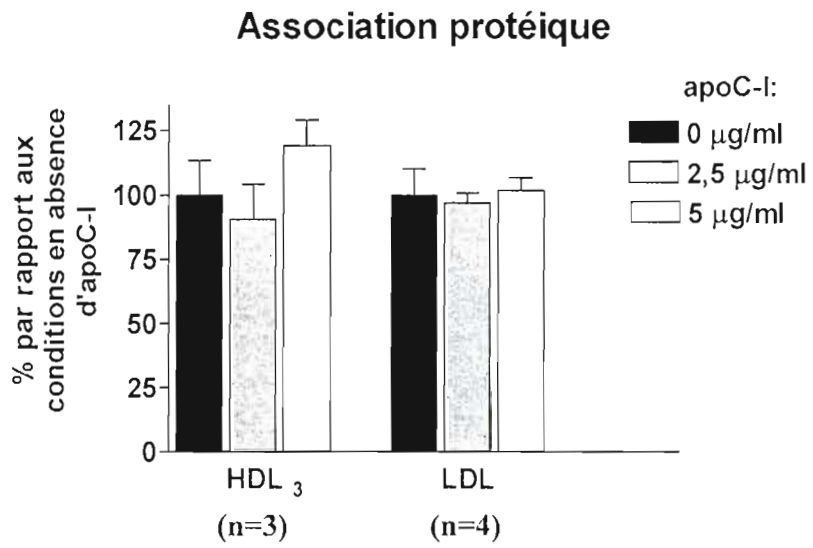
CHAPITRE III

RÉSULTATS

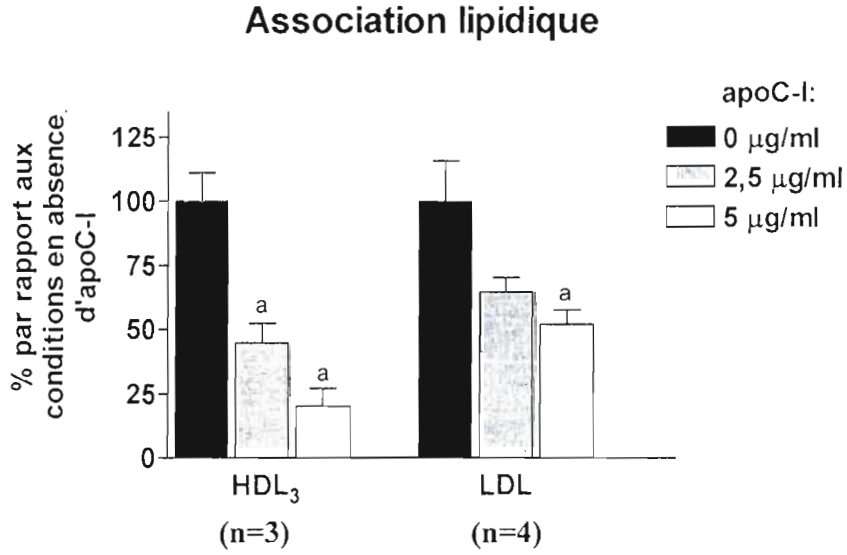
3.1. IMPLICATION DE L'APOC-I PURIFIÉE DANS L'ASSOCIATION ET LA DÉGRADATION DES LDL ET DES HDL_3

Le principal but de cette étude était d'examiner l'effet de l'apoC-I secrétée par les cellules parenchymateuses hépatiques (HepG2) sur le métabolisme des LDL et des HDL_3 par ces mêmes cellules. En premier lieu, des expériences ont été réalisées avec des cellules HepG2 afin de vérifier si l'apoC-I purifiée, ajoutée en concentration croissante dans le milieu extracellulaire, affecte la captation sélective des HDL_3 et des LDL, ainsi que leur taux de dégradation protéique. La figure 4 montre que l'apoC-I induit une réduction dose-dépendante de l'association lipidique des LDL et des HDL_3 (Figure 4B) sans affecter leurs associations protéiques (Figure 4A). En conséquence la captation sélective des EC des LDL et des HDL_3 est aussi diminuée. Ainsi l'addition de 5 µg/ml d'apoC-I purifiée abolit presque complètement la captation sélective des EC à partir des deux lipoprotéines (une perte de 90 %, Figure 4C). A cette concentration, l'effet de l'apoC-I est moins marqué pour l'association des [^{3}H]-CE-LDL ($p<0,05$) que pour l'association des [^{3}H]-CE-HDL_3 ($p<0,01$) puisqu'une perte de 50 % et 80 % respectivement a été observée (Figure 4B). Par contre, la dégradation protéique n'est pas affectée par l'ajout de l'apoC-I purifiée dans le milieu extracellulaire (Figure 4A et 4D).

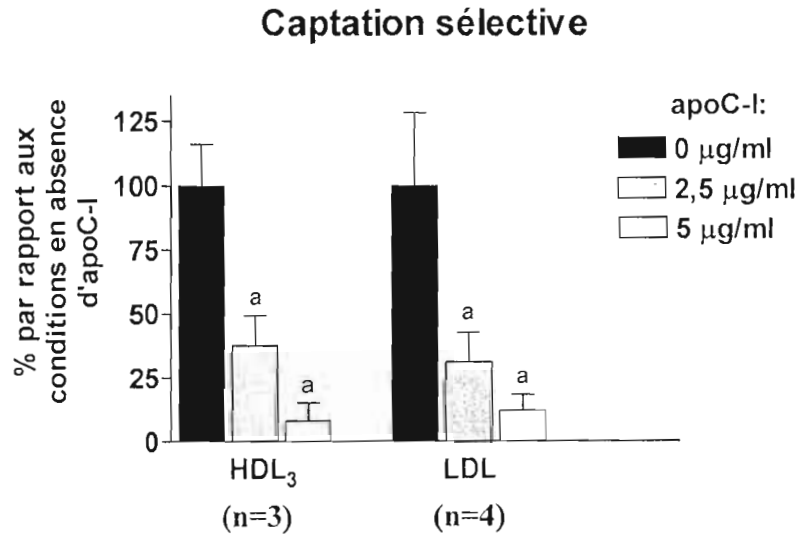
(A)


Association protéique
apoC-I:
0 µg/ml
2,5 µg/ml
5 µg/ml
% par rapport aux conditions en absence d'apoC-I
125
100
75
50
25
0
HDL 3
LDL
(n=3)
(n=4)

(B)


Association lipidique
apoC-I:
0 µg/ml
2,5 µg/ml
5 µg/ml
% par rapport aux conditions en absence d'apoC-I
125
100
75
50
25
0
a
a
a
HDL3
LDL
(n=3)
(n=4)

(C)


Captation sélective
% par rapport aux conditions en absence d'apoC-I
125
100
75
50
25
0
a
a
a
apoC-I:
0 µg/ml
2,5 µg/ml
5 µg/ml
HDL3
LDL
(n=3)
(n=4)

(D)

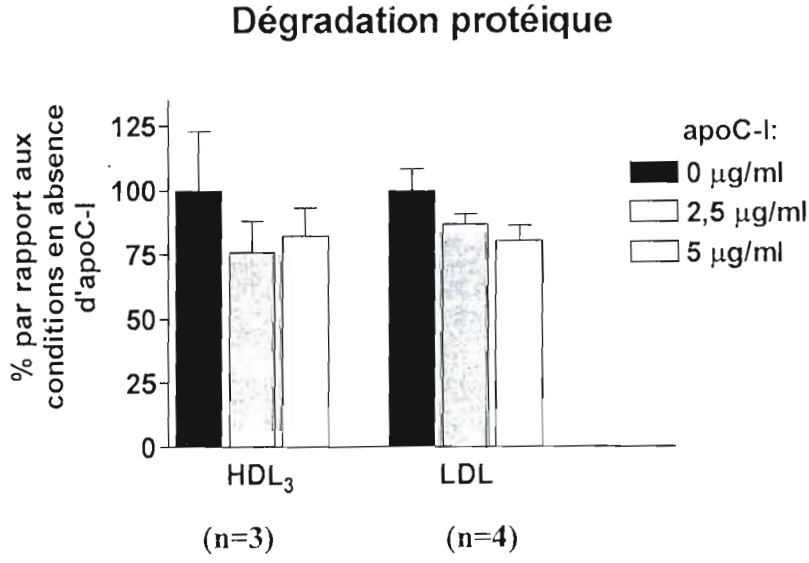

Dégradation protéique
% par rapport aux conditions en absence d'apoC-I
125
100
75
50
25
0
apoC-I:
0 µg/ml
2,5 µg/ml
5 µg/ml
HDL3
LDL
(n=3)
(n=4)

Figure 4: Influence de différentes concentrations d'apoC-I purifiée sur le métabolisme des LDL et des HDL_3 dans des cellules HepG2.

(A) Association des [^{125}I]-LDL et des [^{125}I]-HDL_3; (B) Association des [^{3}H]-EC-LDL et des [^{3}H]-EC-HDL_3; (C) Captation sélective des esters de cholestérol des LDL et des HDL_3; (D) Dégradation des LDL et des HDL_3 par les cellules HepG2 incubées en absence ou en présence d'apoC-I purifiée. Les lipoprotéines marquées (20 µg/ml de [^{125}I]-lipoprotéines et de [^{3}H]-EC-lipoprotéines) ont été incubées pendant 4 heures à 37° C dans des plaques de 12 puits en duplicata en présence de concentrations croissantes d'apoC-I (0; 2,5; 5 µg/ml).

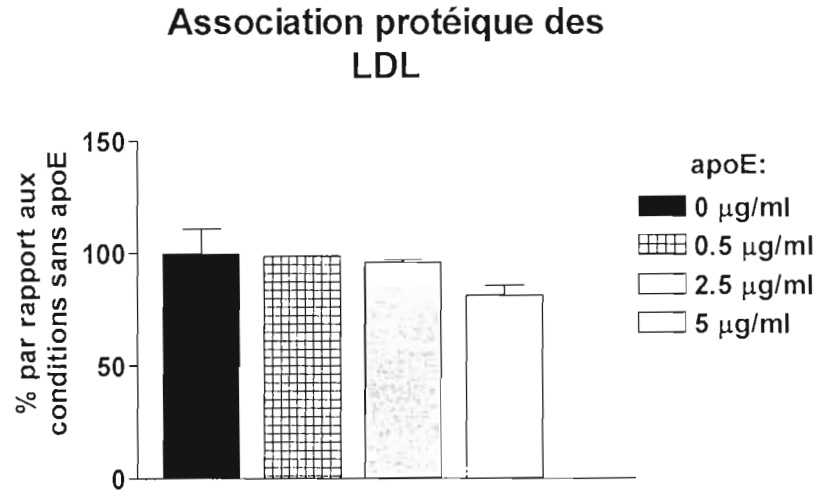
Chaque valeur représente la moyenne +/- SEM du nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. Les valeurs en µg de protéines/mg de protéines cellulaires provenant des cellules HepG2 en absence de l'apoC-I ont été établies à 100 %. Les différences statistiques ont été évaluées par un test de T-pairé où [a] statistiquement différent ($p<0,05$) des valeurs obtenues en absence de l'apoC-I purifiée.

Pour vérifier que l'impact observé de l'apoC-I purifiée sur l'association et la dégradation des LDL et des HDL_3 est spécifique à cette apolipoprotéine, de l'apoE ou de l'apoA-I purifiées ont été ajoutées en concentration croissante dans le milieu extracellulaire. Les essais d'association et de dégradation des LDL par les cellules HepG2 ont été réalisés dans les mêmes conditions que ceux accomplis en présence de l'apoC-I purifiée. Les résultats obtenus avec l'apoE démontrent que celle-ci induit une activation dose-dépendante de l'association lipidique des LDL, sans affecter leur association protéique (Figure 5A et 5B). En conséquence, la captation sélective des EC à partir des LDL est aussi augmentée (Figure 5C). Ainsi, l'addition de 5 µg/ml d'apoE entraîne une augmentation de 470% ($p<0,05$) de la captation sélective des EC à partir des LDL. La dégradation protéique des LDL ne semble pas affectée par la présence de l'apoE purifiée (Figure 5D). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par notre équipe concernant le métabolisme des LDL et des HDL_3 par des cellules HepG2 sur-exprimant l'apoE (Charpentier et al., 2000). En effet, cette étude a démontré que l'association lipidique et la captation sélective des EC des LDL et des HDL_3 sont positivement corrélées avec le taux d'expression de l'apoE par les cellules HepG2.

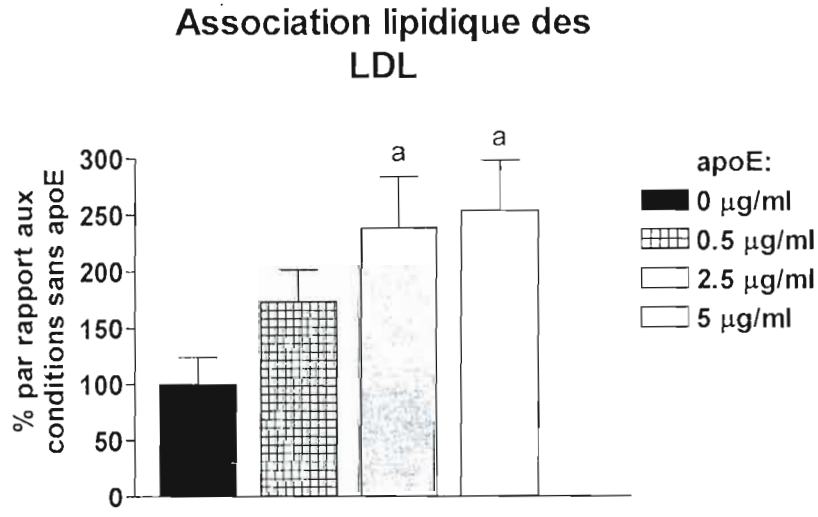
En ce qui concerne l'impact de l'apoA-I purifiée dans le métabolisme des LDL par les cellules HepG2, la figure 6 montre que l'apoA-I n'a pas d'effet sur l'association et la

dégradation des LDL. Ainsi, les résultats obtenus avec l'apoC-I, l'apoE et l'apoA-I purifiées démontrent que les effets observés sont spécifiques à chacune des apolipoprotéines.

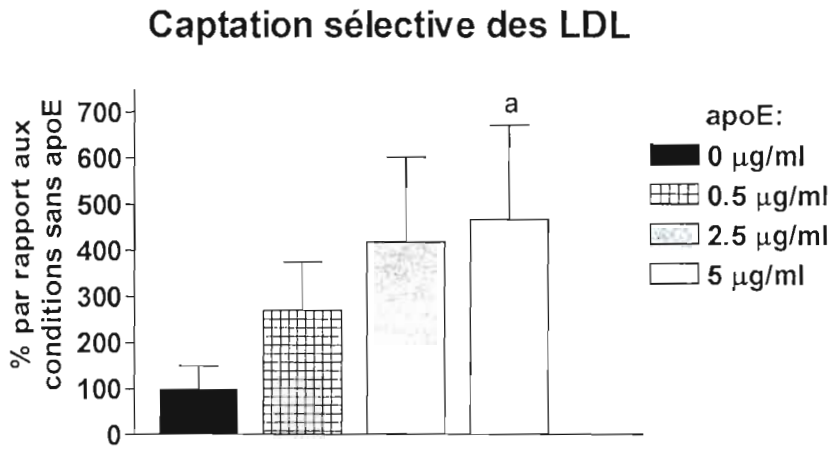
(A)



(B)



(C)



(D)

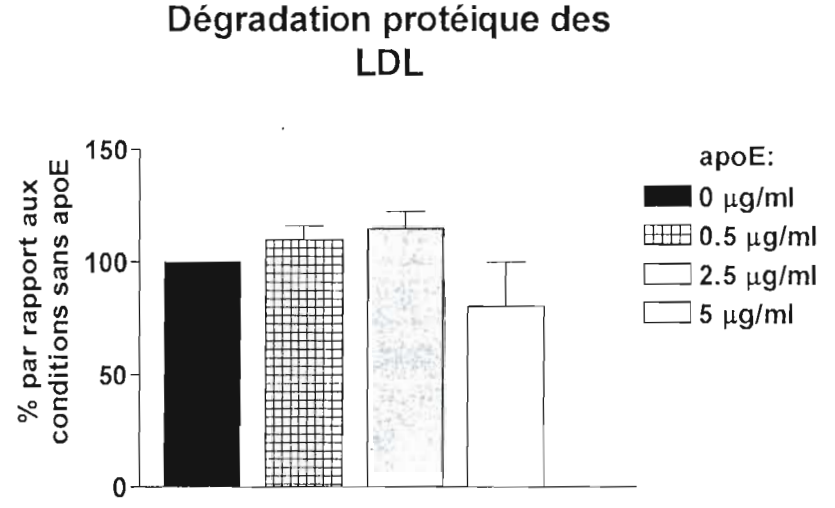


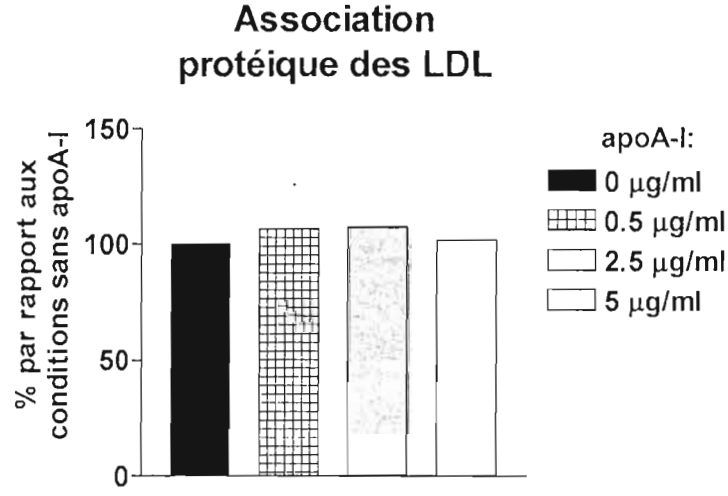
Figure 5 : Effet de différentes concentrations d'apoE purifiée sur le métabolisme des LDL dans des cellules HepG2.

(A) Association des [^{125}I]-LDL; (B) Association des [^{3}H]-EC-LDL; (C) Captation sélective des esters de cholestérol des LDL; (D) Dégradation des LDL par les cellules HepG2 incubées

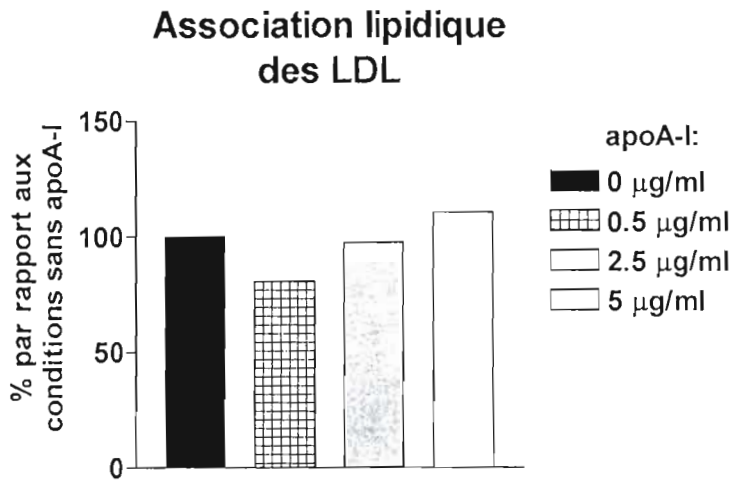
en absence et en présence d'apoE purifiée. Les lipoprotéines marquées (20 µg/ml de [^{125}I]-LDL et de [^{3}H]-EC-LDL) ont été incubées pendant 4 heures à 37° C dans des plaques de 12 puits en duplicata en présence de concentrations croissantes d'apoE (0; 0,5; 2,5; 5 µg/ml).

Chaque valeur représente la moyenne +/- SEM de deux expériences. Les valeurs en µg de protéines/mg de protéines cellulaires provenant des cellules HepG2 en absence de l'apoE ont été établies à 100 %. Les différences statistiques ont été évaluées par un test de T-pairé où [a] statistiquement différent ($p<0,05$) des valeurs obtenues en absence de l'apoE purifiée.

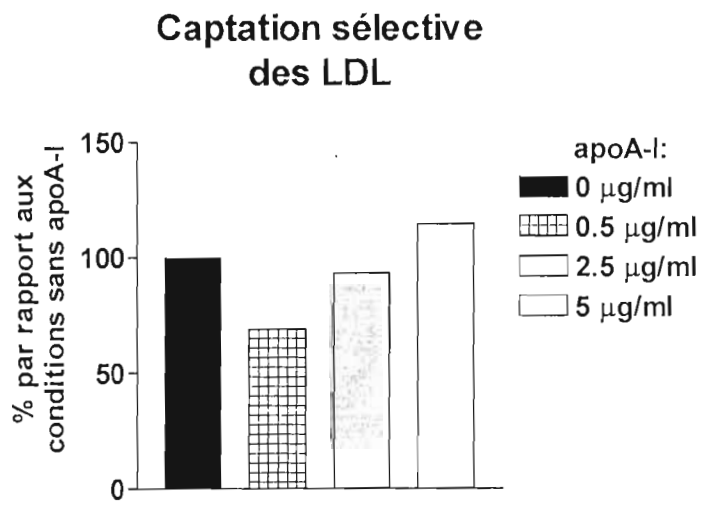
(A)



(B)


Association lipidique
des LDL
% par rapport aux
conditions sans apoA-I
150
100
50
0
apoA-I:
0 µg/ml
0.5 µg/ml
2.5 µg/ml
5 µg/ml

(C)


Captation sélective
des LDL
% par rapport aux
conditions sans apoA-I
150
100
50
0
apoA-I:
0 µg/ml
0.5 µg/ml
2.5 µg/ml
5 µg/ml

(D)

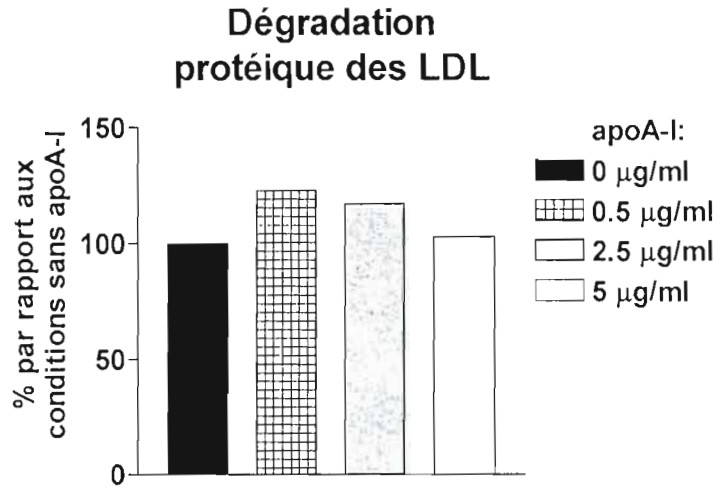


Figure 6 : Effet de différentes concentrations d'apoA-I purifiée sur le métabolisme des LDL dans des cellules HepG2.

(A) Association des [^{125}I]-LDL; (B) Association des [^{3}H]-EC-LDL; (C) Captation sélective des esters de cholestérol des LDL; (D) Dégradation des LDL par les cellules HepG2 incubées en absence et en présence d'apoA-I purifiée. Les lipoprotéines marquées (20 µg/ml de [^{125}I]-LDL et de [^{3}H]-EC-LDL) ont été incubées pendant 4 heures à 37° C dans des plaques de 12 puits en duplicata en présence de concentrations croissantes d'apoA-I (0; 0,5; 2,5; 5 µg/ml).

Chaque valeur est représentative d'une expérience. Les valeurs en µg de protéines/ mg de protéines cellulaires provenant des cellules HepG2 en absence de l'apoA-I ont été établies à 100 %.

3.2. OBTENTION DE TRANSFORMANTS STABLES ET TRANSITOIRES EXPRIMANT DIFFÉRENTS NIVEAUX D'APOC-I ENDOGÈNE

L'apoC-I purifiée ajoutée dans le milieu extracellulaire inhibe la captation sélective des EC des LDL et des HDL_3 à une concentration aussi faible que 5 µg/ml, il devient donc important de définir l'effet de la production endogène de l'apoC-I par les cellules HepG2 sur l'association et la dégradation des LDL et des HDL_3 par ces cellules. De plus, contrairement à l'apoC-I purifiée utilisée dans le cadre des expériences précédentes, l'apoC-I secrétée par les cellules HepG2 constitue une apolipoprotéine plus physiologique, car probablement elle peut être associée à des lipides tôt dans la secrétion. Ainsi des transformants stables sur-exprimant l'apoC-I et des transformants transitoires sous-exprimant l'apoC-I ont été générés.

3.2.1. Conception d'un modèle cellulaire contenant l'ADNc de l'apoC-I en orientation sens

Les lignées stables cellulaires sur-exprimant l'apoC-I ont été générées avec un vecteur d'expression eucaryote contenant l'ADNc de l'apoC-I. Le vecteur d'expression pcDNA3.1(-) (Figure 7) permet une expression stable dans les cellules eucaryotes d'origine hépatique. Avant de procéder à la création de vecteurs recombinants, l'integrité du vecteur a été analysée par digestion complète avec l'enzyme de restriction *HindIII*, ce qui a permis de le linéariser et de vérifier son poids moléculaire de 5,4 kpb (Figure 8). L'ADNc de l'apoC-I a été obtenu par RT-PCR à partir d'ARN total de cellules HepG2, en utilisant des amorces spécifiques du gène de l'apoC-I, comportant de plus des sites de restriction *XhoI* et *HindIII*, respectivement du côté 5'et 3' du gène (Figure 2). Les résultats de la RT-PCR ont été contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %, le produit d'amplification du gène de l'apoC-I étant de 300 pb (Figure 9). L'ADNc de l'apoC-I et le vecteur d'expression pcDNA3.1(-) ont été digérés séparément avec les endonucléases *XhoI* et *HindIII*, puis ils ont été liés par la ligase du phage T4. La présence de l'insert au niveau du vecteur recombinant

pcDNA 3.1_apoC-I a été vérifiée par une digestion enzymatique de l'ADN purifié à partir des bactéries recombinantes avec les endonucléases *HindIII* et *NdeI*. Puisque l'enzyme *NdeI* coupe à 470 bp en amont du site de restriction *XhoI*, et la taille de l'insert est de 300 pb, la digestion a produit deux fragments, dont un de 770 pb en présence de l'insert (Figure 10). La figure 11 représente la construction du vecteur pcDNA3.1(-) avec l'ADNc de l'apoC-I. Le séquençage du vecteur recombinant a permis de confirmer l'orientation de l'insert et de vérifier sa séquence nucléotidique (Figure 12).

3.2.2. Obtention de transformants transitoires sous-exprimant l'apoC-I

La stratégie de siRNA a été employée pour générer des transformants transitoires exprimant un taux plus faible d'apoC-I que les cellules HepG2 normales. La figure 3 représente la séquence nucléotidique du duplexe d'amorces de siRNA utilisé pour interférer avec l'ARNm de l'apoC-I.

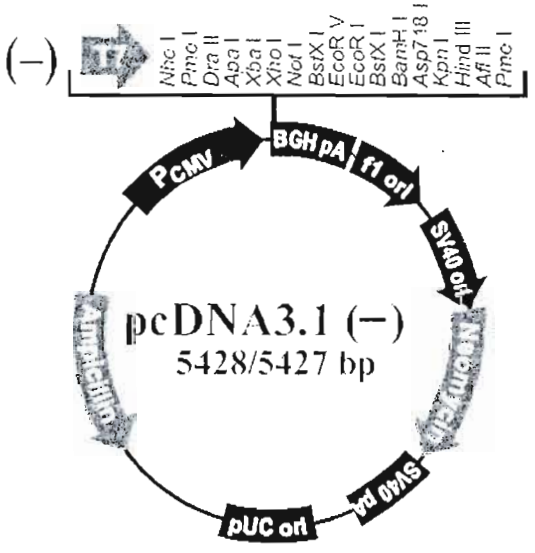


Figure 7 : Représentation schématique du vecteur d'expression eucaryote pcDNA 3.1(-).

Ce vecteur a été utilisé afin d'introduire l'ADNc du gène humain de l'apoC-I dans une orientation sens. L'ADNc de l'apoC-I et le vecteur d'expression pcDNA3.1(-) ont été digérés

séparément avec les endonucléases *XhoI* et *HindIII*, puis ils ont été liés par la ligase du phage T4. La présence de l'insert au niveau du vecteur recombinant pcDNA 3.1_apoC-I a été vérifiée par une digestion enzymatique avec les endonucléases *HindIII* et *NdeI*, l'enzyme *NdeI* coupant à 470 bp en amont du site de restriction *XhoI*.

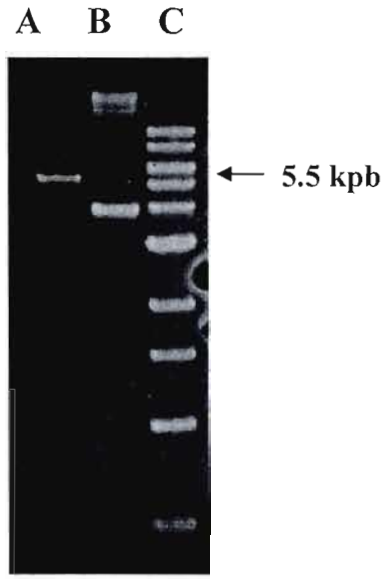


Figure 8 : Analyse de l'ADN du vecteur d'expression pcDNA 3.1.

(A) Une digestion du vecteur par l'endonucléase *HindIII* a permis de le linéariser et de vérifier son poids moléculaire par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %; (B) Le vecteur pcDNA 3.1 non digéré ; (C) Marqueurs de poids moléculaire.

Figure 9 : Analyse de la RT-PCR de l'ADNc de l'apoC-I par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

(A) Vingt µl de l'échantillon de la PCR; (B) Cinquante µl de l'échantillon de la de PCR; (C) Marqueurs de poids moléculaire.

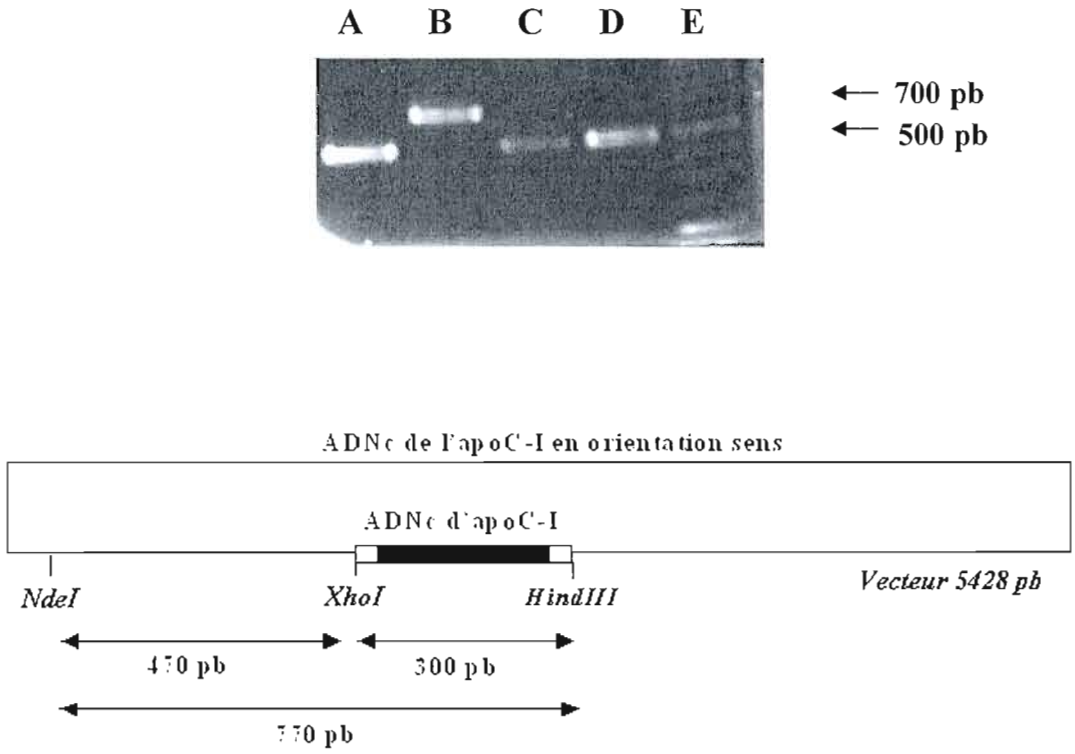


Figure 10 : Analyse de l'ADN du vecteur recombinant pcDNA 3.1_apoC-I.

Une digestion du vecteur recombinant par les endonucléases *NdeI* et *HindIII* a permis de vérifier la présence de l'ADNc de l'apoC-I, et de confirmer l'orientation sens de l'insert. (A, C, D) Vecteurs qui ne contiennent pas le gène de l'apoC-I ; (B) Vecteur recombinant contenant l'ADNc de l'apoC-I ; (E) Marqueurs de poids moléculaire. Le schéma du dessous représente l'aspect théorique des fragments d'ADN générés pour les vecteurs ayant intégré ou non l'ADNc de l'apoC-I.

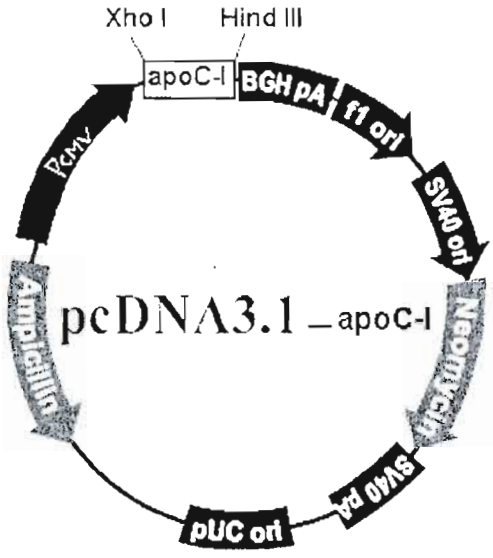


Figure 11 : Représentation schématique du vecteur recombinant pcDNA 3.1_apoC-I contenant l'ADNc humain de l'apoC-I, selon une orientation sens.

GCCATGAGGCTCTTCCTGTCGCTCCCGGTCCTGGTGGTGGTTCTGTCGATC
GTCTTGGAAGGCCCAGCCCCAGCCCAGGGGACCCCAGACGTCTCCAGTGC
CTTGGATAAGCTGAAGGAGTTTGGAAACACACTGGAGGACAAGGCTCGG
GAACTCATCAGCCGCATCAAACAGAGTGAACTTTCTGCCAAGATGCGGGA
GTGGTTTTCAGAGACATTTCAGAAAGTGAAGGAGAAACTCAAGATTGACT
CATGAGGACCTGAAG

Figure 12 : Séquence nucléotidique obtenue par séquençage du vecteur pcDNA 3.1 contenant l'ADNc de l'apoC-I humaine. Le gène de l'apoC-I est souligné.

3.3. NIVEAU DE SÉCRÉTION DE L'APOC-I DES CELLULES HepG2 TRANSFECTÉES AVEC LE VECTEUR RECOMBINANT CONTENANT L'ADNc DE L'APOC-I

Les cellules HepG2 ont été transfectées soit avec le vecteur sans insert, soit avec le vecteur contenant l'ADNc de l'apoC-I en orientation sens. Quinze clones ont été testés pour leur niveau de production d'apoC-I dans le milieu extracellulaire. D'après les résultats de l'ELISA réalisé sur des milieux de culture, huit de ces clones possédaient une sécrétion supérieure de l'apoC-I, d'environ 2,5 fois, comparativement à celle des cellules HepG2 normales. Deux de ces clones ont été choisis à cause de leur taux de sur-expression élevé et parce qu'ils présentaient une morphologie et une vitesse de croissance similaires à celles des cellules HepG2. La figure 13 montre le niveau d'expression de ces clones ré-identifiés en fonction de leurs taux de sur-expression en apoC-I. Ainsi les transformants apoC-I 2.9 et apoC-I 3.8 ont des niveaux d'expression de 286 % et de 378 % respectivement par rapport à celui des cellules contrôles. Il est à noter que les cellules transfectées avec le vecteur seul et la lignée de cellules HepG2 présentent des niveaux d'expression similaires d'apoC-I sécrétée.

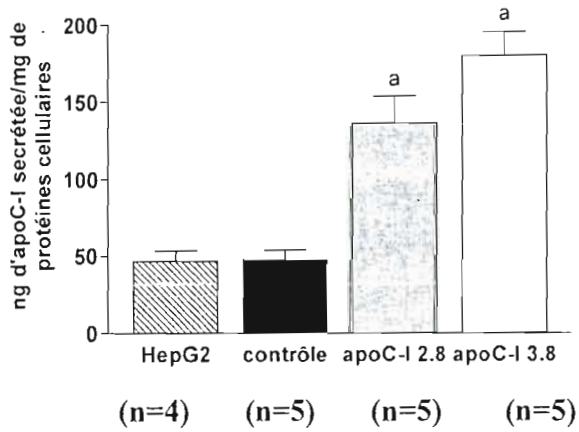


Figure 13 : Quantification par ELISA du taux de l'apoC-I sécrétée dans le milieu extracellulaire par les cellules HepG2, les cellules HepG2 transfectées avec les vecteur vide (contrôle) et les cellules HepG2 transfectées avec le vecteur recombinant contenant l'ADNc de l'apoC-I (apoC-I 2.9 et apoC-I 3.8).

Chaque valeur représente la moyenne +/- SEM d'un nombre différent d'analyses indiqué entre parenthèses. Les différences statistiques ont été évaluées par un test de T-pairé où a statistiquement différent ($p<0,05$) des valeurs obtenues avec les cellules contrôles.

3.4. NIVEAU DE SÉCRÉTION DE L'APOC-I DES CELLULES HEPG2 TRANSFECTÉES AVEC DES siRNA DIRIGÉS CONTRE L'ARNm DE L'APOC-I

Les cellules HepG2 ont été transfectées dans les mêmes conditions soit avec des siRNA non spécifiques de l'ARNm de l'apoC-I (contrôle négatif), soit avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de l'apoC-I. Les résultats de l'ELISA montrent une inhibition de la sécrétion d'apoC-I de 50 % et de 55 % en comparaison aux niveaux observés avec les cellules HepG2 et le contrôle négatif respectivement (Figure 14).

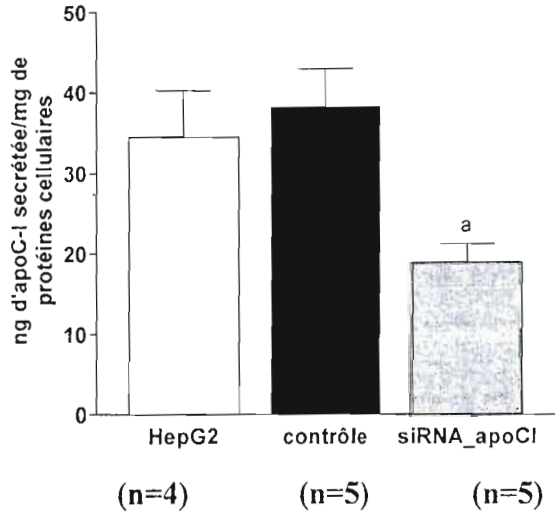


Figure 14 : Quantification par ELISA du taux de l'apoC-I sécrétée dans le milieu extracellulaire par les cellules HepG2, les cellules HepG2 transfectées avec des siRNA non spécifiques de l'ARNm de l'apoC-I (contrôle négatif) ou transfectées avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de l'apoC-I.

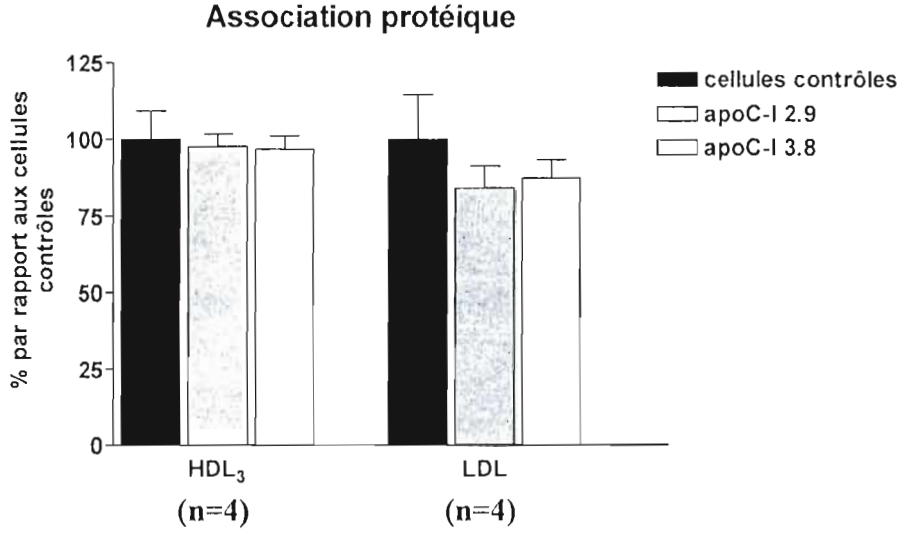
Chaque valeur représente la moyenne +/- SEM d'un nombre différent d'analyses indiqué entre parenthèses. Les différences statistiques ont été évaluées par un test de T-pairé où [a] statistiquement différent ($p<0,05$) des valeurs obtenues avec les cellules contrôles.

3.5. MÉTABOLISME DES LDL ET DES HDL_3 PAR DES CELLULES HepG2 EXPRIMANT DIFFÉRENTS NIVEAUX DE L'APOC-I

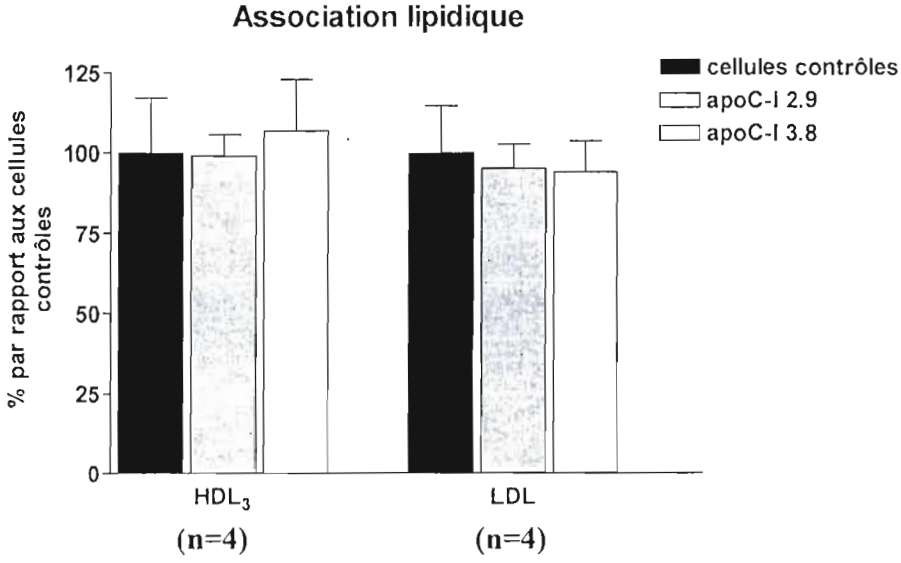
Le deuxième volet de cette étude a été d'évaluer si le changement d'expression de l'apoC-I par les cellules HepG2 peut affecter la capacité de ces cellules à capter et à dégrader les LDL et les HDL_3. En d'autres mots, il s'agissait ici d'analyser l'effet « autocrine » de l'apoC-I. Globalement, le métabolisme des LDL et des HDL_3 ne diffère pas entre les clones sur-exprimant l'apoC-I et les cellules contrôles (Figure 15). En effet, une légère diminution de l'association et la dégradation protéiques des LDL est observée dans les cellules sur-exprimant l'apoC-I, mais cette diminution est non significative par rapport aux résultats du contrôle (Figure 15A et 15D).

En ce qui concerne l'effet de l'inhibition de l'expression de l'apoC-I par les cellules HepG2, les figures 16A et 16B révèlent que les cellules sous-exprimant l'apoC-I montrent une augmentation de l'association protéique et lipidique des LDL et des HDL_3, bien que cette augmentation ne soit significative que pour les LDL ($p<0,05$). La stimulation de l'association protéique des LDL n'est toutefois pas corrélée avec une augmentation de leur dégradation protéique (Figure 16D). La captation sélective des EC des HDL_3 a été significativement augmentée de 29 % ($p<0,05$) dans les cellules sous-exprimant l'apoC-I par rapport à celle des cellules contrôles, tandis que la captation sélective des EC des LDL n'a pas été affectée (Figure 16D). Ainsi, la stratégie de sur-expression de l'apoC-I n'a pas induit de changements significatifs dans le métabolisme des LDL et des HDL_3, alors que celle d'une sous-expression provoque une augmentation de l'association protéique et lipidique des LDL et une stimulation de la captation sélective des EC des HDL_3.

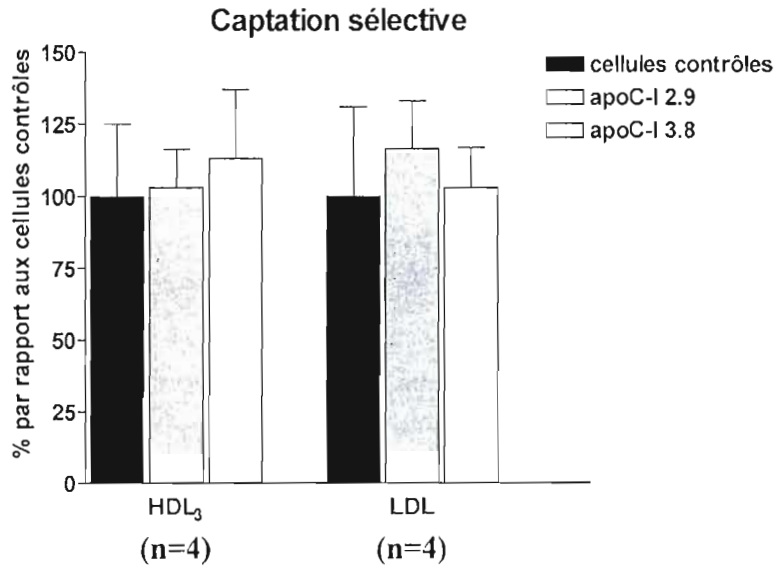
(A)


Association protéique
% par rapport aux cellules contrôles
125
100
75
50
25
0
cellules contrôles
apoC-I 2.9
apoC-I 3.8
HDL3
LDL
(n=4)
(n=4)

(B)


Association lipidique
% par rapport aux cellules contrôles
125
100
75
50
25
0
cellules contrôles
apoC-I 2.9
apoC-I 3.8
HDL3
LDL
(n=4)
(n=4)

(C)



(D)

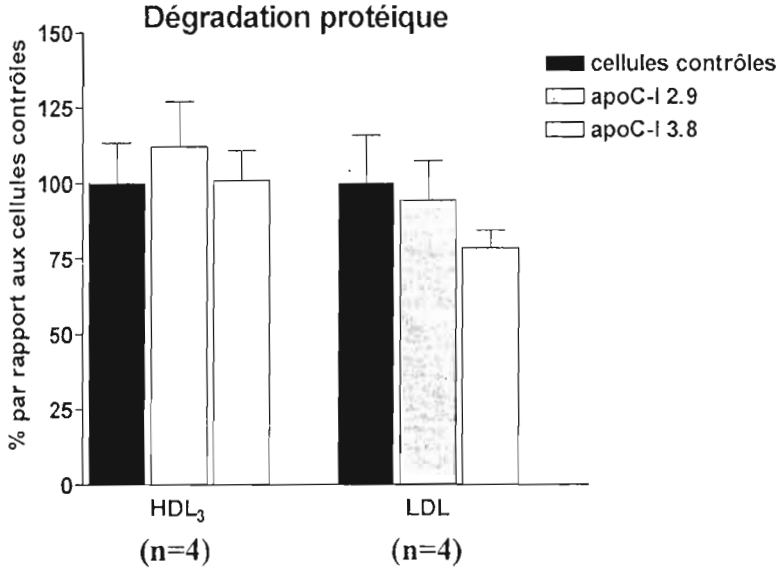


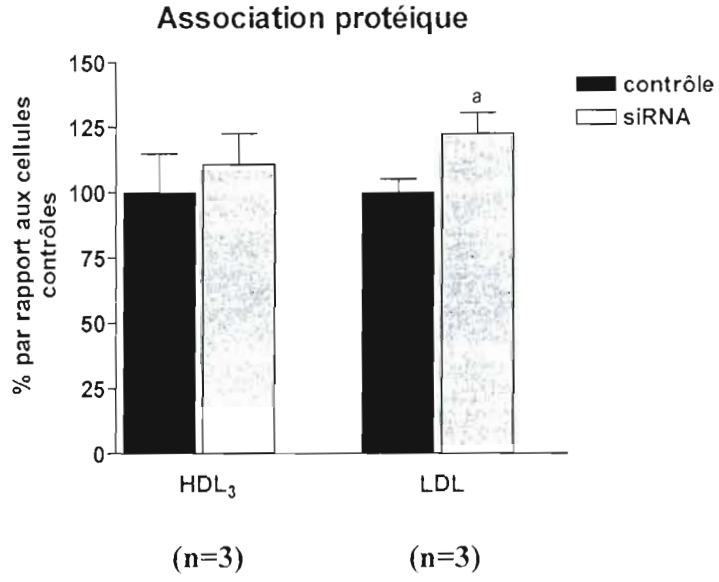
Figure 15 : Effet de l'apoC-I endogène sur le métabolisme des LDL et des HDL_3.

(A) Association des [^{125}I]-LDL et des [^{125}I]-HDL_3; (B) Association des [^{3}H]-EC-LDL et des [^{3}H]-EC-HDL_3; (C) Captation sélective des esters de cholestérol des LDL et des HDL_3; (D)

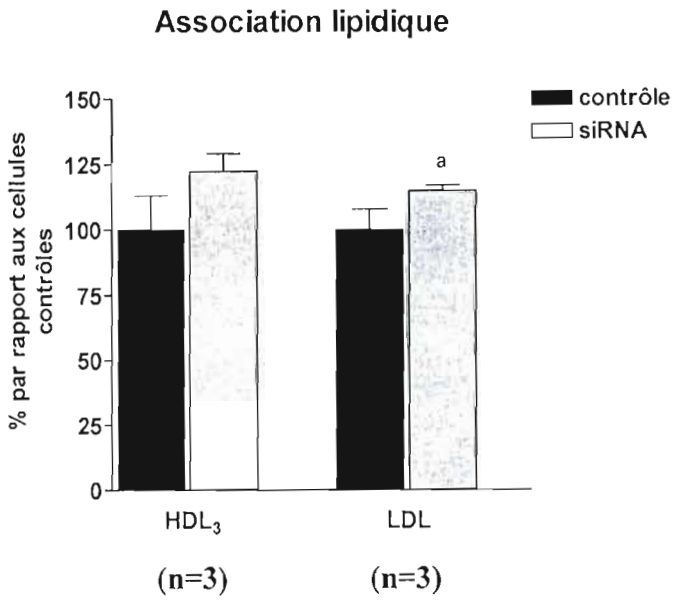
Dégradation des LDL et des HDL_3 par les cellules HepG2 transfectées avec le vecteur seul (contrôle) et les cellules HepG2 transfectées avec le vecteur recombinant contenant l'ADNc de l'apoC-I.

Chaque valeur représente la moyenne +/- SEM du nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. Les valeurs en µg de protéines/ mg de protéines cellulaires provenant du contrôle (cellules HepG2 transfectées avec le vecteur seul) ont été établies à 100 %. Les différences statistiques ont été évaluées par un test de T-pairé où [a] statistiquement différent ($p<0,05$) des valeurs obtenues avec les cellules contrôles.

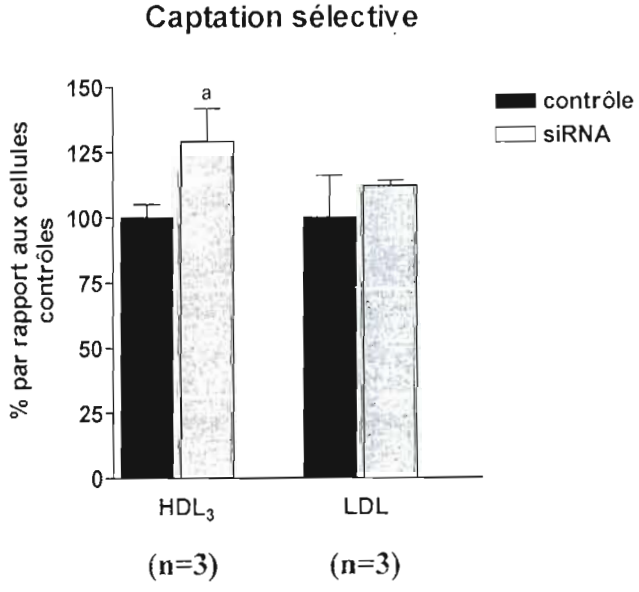
(A)



(B)


Association lipidique
contrôle
siRNA
% par rapport aux cellules contrôles
150
125
100
75
50
25
0
a
HDL3
LDL
(n=3)
(n=3)

(C)


Captation sélective
contrôle
siRNA
% par rapport aux cellules contrôles
150
125
100
75
50
25
0
a
HDL3
LDL
(n=3)
(n=3)

(D)

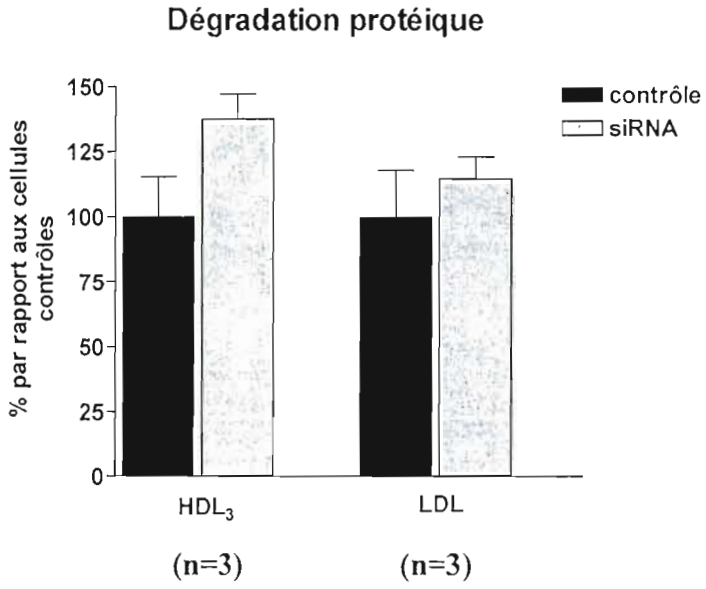


Figure 16 : Effet de l'inhibition de l'apoC-I par la technique de l'ARNi sur le métabolisme des LDL et des HDL_3.

(A) Association des [^{125}I]-LDL et des [^{125}I]-HDL_3; (B) Association des [^{3}H]-EC-LDL et des [^{3}H]-EC-HDL_3; (C) Captation sélective des esters de cholestérol des LDL et des HDL_3; (D) Dégradation des LDL et des HDL_3 par les cellules HepG2 traitées avec des siRNA non spécifiques à l'ARNm de l'apoC-I (contrôle négatif) et par les cellules HepG2 traitées avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de l'apoC-I.

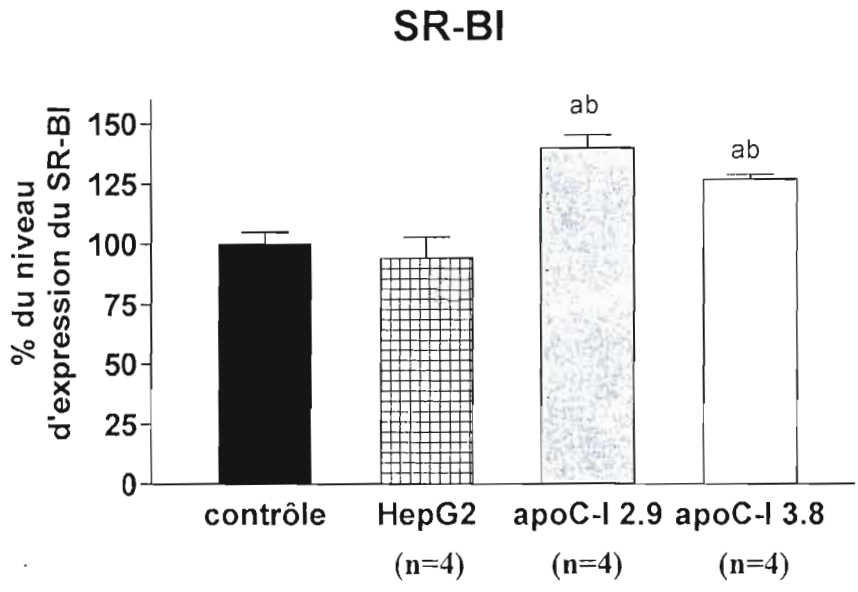
Chaque valeur représente la moyenne +/- SEM du nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. Les valeurs en µg de protéines/ mg de protéines cellulaires provenant du contrôle négatif ont été établies à 100 %. Les différences statistiques ont été évaluées par un test de T-pairé où [a] statistiquement différent ($p<0,05$) des valeurs obtenues avec les cellules contrôles.

3.6. NIVEAU D'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS SR-BI, rLDL ET CD36 DANS LES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES HepG2

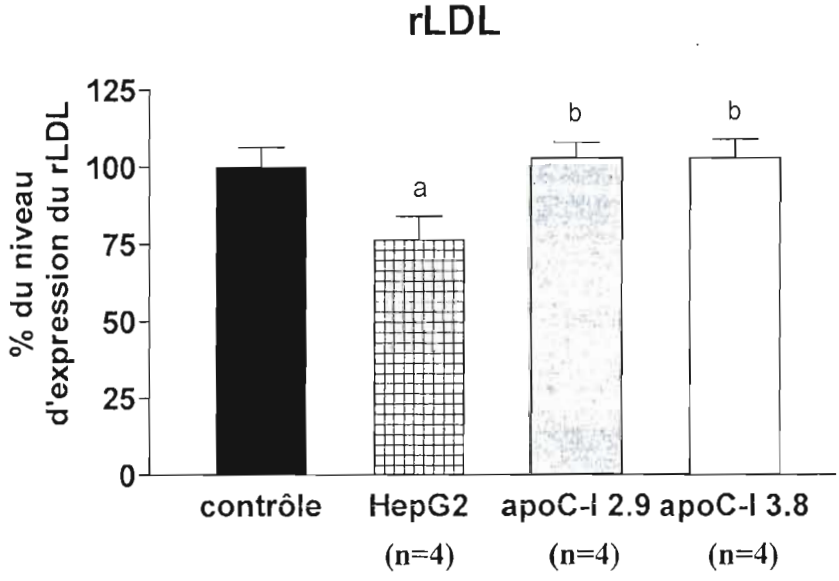
Les niveaux d'expression des récepteurs impliqués dans le métabolisme hépatique des LDL et des HDL_3 ont été vérifiés afin de mieux comprendre ce qui se produit dans les cellules HepG2 exprimant différents niveaux d'apoC-I. Après l'immunobuvardage, les taux d'expression des protéines ont été quantifiés par densitométrie. La figure 17A montre que les cellules sur-exprimant l'apoC-I ont un taux d'expression plus élevé de SR-BI en comparaison avec celui des cellules contrôles ($p<0,01$) et cela de 40 % et de 27 % pour les clones apoC-I 2.9 et apoC-I 3.8 respectivement. L'effet de ce résultat reste inconnu puisqu'aucune modification de l'association protéique ou lipidique des LDL et des HDL_3 n'a été observée lors des essais précédents (Figure 15A et 15B). Il est toutefois possible que l'effet de l'apoC-I dans l'association des lipoprotéines soit sous-estimé à cause du niveau élevé de SR-BI dans les clones sur-exprimant l'apoC-I. Ceux-ci montrent aussi un niveau plus élevé de SR-BI ($p<0,05$) par rapport à celui des cellules HepG2 (Figure 17A). En ce qui concerne la modulation de l'expression du rLDL, son niveau est significativement plus faible ($p<0,05$) dans les cellules HepG2 que dans les cellules contrôles (Figure 17B). En conséquence, les clones sur-exprimant l'apoC-I montrent un taux plus élevé d'expression de rLDL de 27 % par rapport à celui des cellules HepG2. Aucun changement n'est observé dans l'expression du CD36 dans les clones apoC-I 2.9 et apoC-I 3.8 en comparaison avec l'expression du CD36 dans les cellules contrôles (Figure 17C).

Enfin, les niveaux d'expression des récepteurs SR-BI, rLDL et CD36 dans les cellules sous-exprimant l'apoC-I ne semblent pas affectés par la diminution de l'expression de l'apoC-I (Figure 18). Ainsi, l'augmentation de la captation sélective des HDL_3 et l'augmentation de l'association protéique et lipidique des LDL dans les cellules sous-exprimant l'apoC-I ne sont pas dues à une stimulation de l'expression des récepteurs hépatiques, mais plutôt à un autre mécanisme.

(A)


SR-BI
% du niveau d'expression du SR-BI
150
125
100
75
50
25
0
ab
ab
contrôle
HepG2
apoC-I 2.9
apoC-I 3.8
(n=4)
(n=4)
(n=4)

(B)


rLDL
% du niveau d'expression du rLDL
125
100
75
50
25
0
a
b
b
contrôle
HepG2
apoC-I 2.9
apoC-I 3.8
(n=4)
(n=4)
(n=4)

(C)

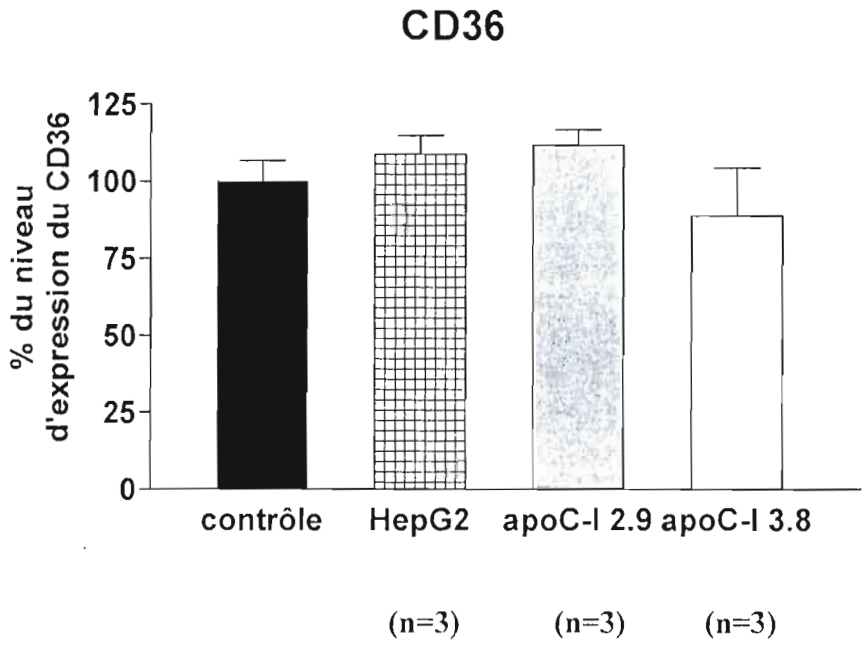


Figure 17 : Niveau d'expression des récepteurs SR-BI (A), rLDL (B) et CD36 (C) dans les différents types de cellules HepG2.

Les protéines totales cellulaires ont été extraites avec du Triton X-100 et les protéines (50, 100 et 50 µg respectivement) ont été séparées sur un gel de 8 % en polyacrylamide en condition réductrice (SDS-PAGE) et révélées par un anticorps polyclonal anti-SR-BI (1 :5000), un anticorps anti-rLDL (1 :500) et un anticorps anti-CD36 (1 :1000). Par la suite les anticorps ont été révélés par immunochemiluminescence.

Les valeurs obtenues sont des moyennes +/- SEM du nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. Les pourcentages d'expression de chaque protéine provenant des cellules contrôles (cellules HepG2 transfectées avec le vecteur seul) ont été établies à 100 %. Les différences statistiques ont été évaluées par un test de T-pairé où [a] statistiquement différent ($p<0,01$) des valeurs obtenues avec les cellules contrôles et [b] statistiquement différent ($p<0,05$) des valeurs obtenues avec les cellules HepG2.

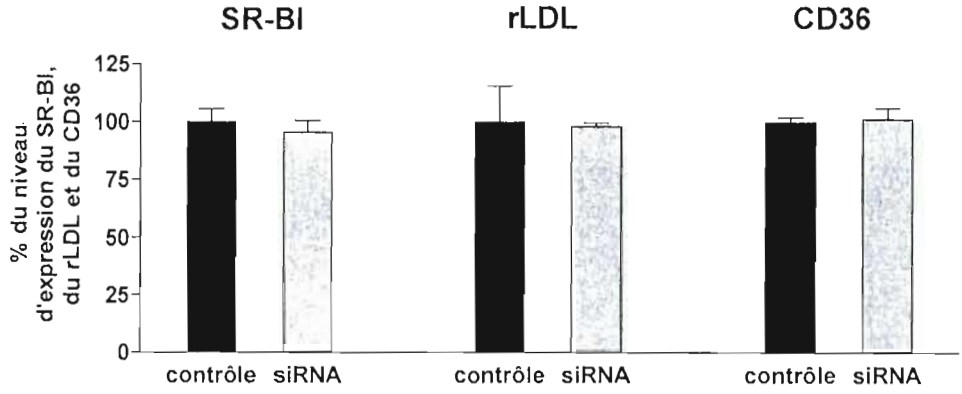


Figure 18 : Niveau d'expression des récepteurs SR-BI, rLDL et CD36 dans des cellules HepG2 transfectées avec des siRNA non spécifiques de l'ARNm de l'apoC-I (contrôle) ou transfectées avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de l'apoC-I.

Les protéines totales cellulaires ont été extraites avec du Triton X-100 et les protéines (50, 100 et 50 µg respectivement) ont été séparées sur un gel de 8 % en polyacrylamide en condition réductrice (SDS-PAGE) et révélées par un anticorps polyclonal anti-SR-BI (1 :5000) ou un anticorps anti-rLDL (1 :500) ou un anticorps anti-CD36 (1 :1000). Par la suite les anticorps ont été révélés par immunochemiluminescence, et l'expression des protéines analysée par densitométrie.

Les valeurs obtenues sont des moyennes +/- SEM de trois expériences. Les pourcentages d'expression de chaque protéine provenant des cellules contrôles ont été établis à 100 %.

3.7. IMPACT D'UN MILIEU ENRICHI EN APOC-I ENDOGÈNE SUR LE MÉTABOLISME DES LDL ET DES HDL_3 DANS DES CELLULES HepG2

Les résultats d'association et de dégradation des LDL et des HDL_3 sur des cellules sur-exprimant l'apoC-I présentent de différences notables en comparaison avec ceux obtenus pour les essais utilisant l'apoC-I purifiée exogène. En effet, la quantité d'apoC-I endogène secrétée dans le milieu de culture est de 180 ng/ml, ce qui est 14 fois inférieur à la quantité d'apoC-I purifiée (2,5 µg/ml) induisant l'inhibition de la captation sélective des EC des LDL

et des HDL_3 dans les cellules HepG2 (Figure 4C). Différentes stratégies élaborées schématiquement à la figure 19 ont été suivies afin de détecter un effet de l'apoC-I endogène.

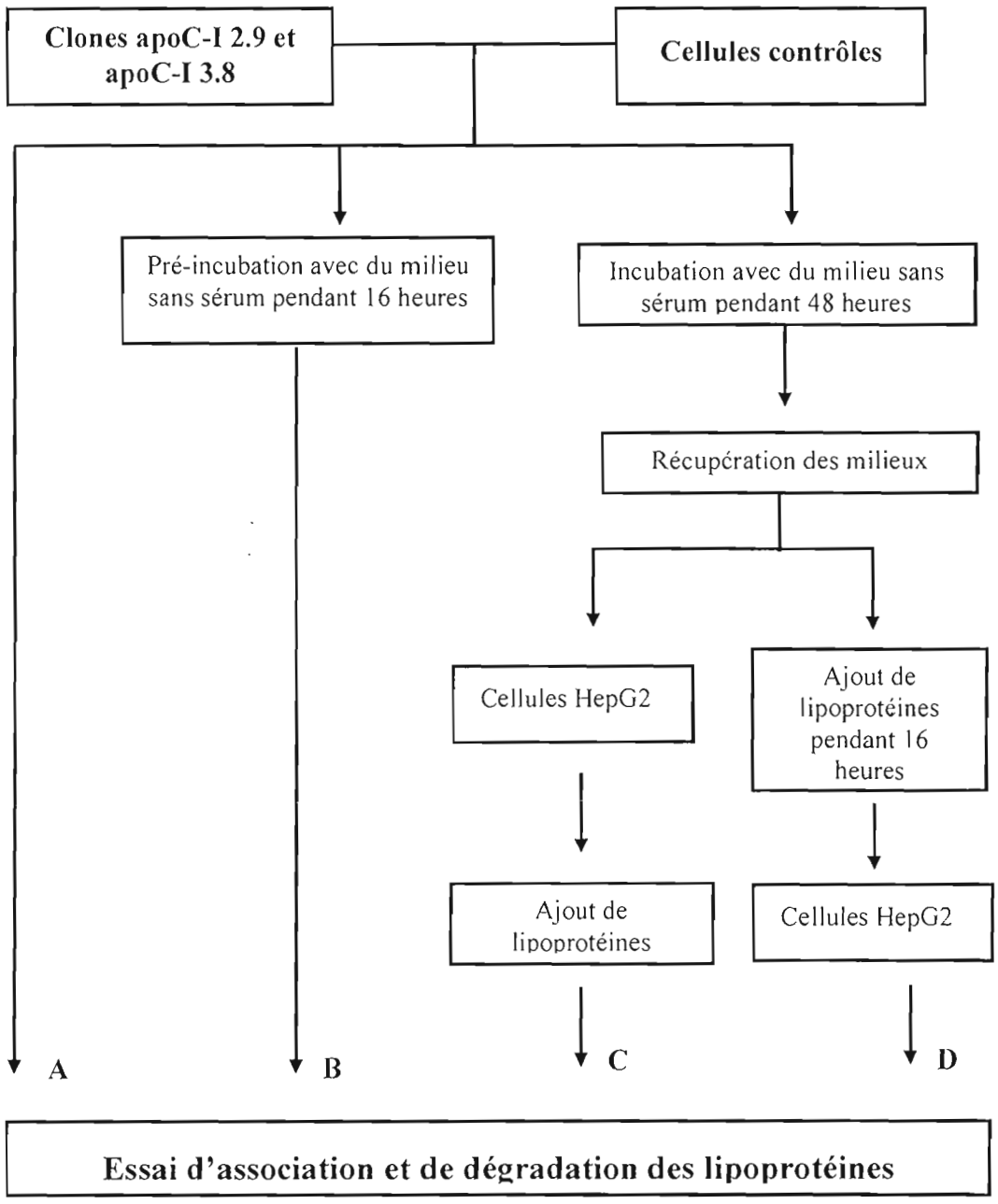


Figure 19. Essais d'association et de dégradation des LDL et des HDL_3 en présence de milieu enrichi ou non en apoC-I endogène.

Essai d'association et de dégradation des lipoprotéines réalisé avec (A) du milieu normal (non enrichi en apoC-I endogène). L'essai a été réalisé suivant le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes; (B) du milieu enrichi en apoC-I suite à une pré-incubation des cellules sur-exprimant l'apoC-I avec du milieu sans sérum. Les cellules ont été pré-incubées pendant 16 heures avant l'essai dans 300 µl par puits de milieu sans sérum de bœuf fœtal; (C) du milieu enrichi en apoC-I endogène. Les cellules contrôles et les clones sur-exprimant l'apoC-I ont été incubées pendant 48 heures dans 500 µl par puits de milieu sans sérum de bœuf fœtal. Les milieux ont été ensuite récoltés, et les essais ont été réalisés sur des cellules HepG2 avec ces milieux; (D) du milieu enrichi en apoC-I et pré-incubé avec les lipoprotéines. Les cellules contrôles et les cellules sur-exprimant l'apoC-I ont été incubées 48 heures dans 500 µl par puits de milieu sans sérum de bœuf fœtal. Après avoir récolté les milieux, ceux-ci ont été incubés pendant 16 heures à 37° C avec les lipoprotéines marquées et non marquées. Les essais ont été ensuite effectués sur des cellules HepG2.

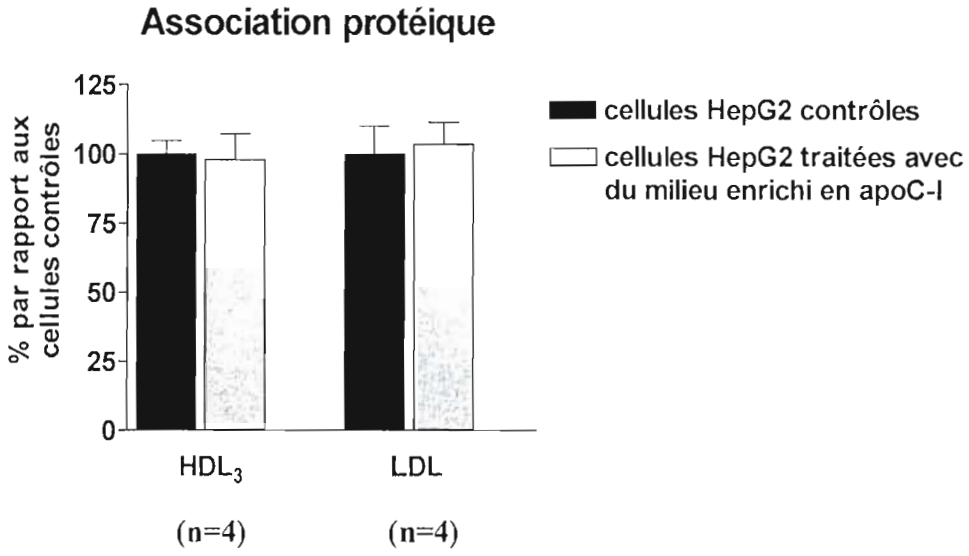
Ainsi pour concentrer le milieu extracellulaire en apoC-I endogène, des cellules sur-exprimant l'apoC-I (apoC-I 3.8) et des cellules HepG2 ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu MEM sans sérum (celui-ci pouvant contenir de l'apoC-I bovin). Les deux types de milieux ont ensuite été récoltés et utilisés, dans un premier temps pour des essais d'association et de dégradation des LDL et des HDL_3 sur des cellules HepG2 (Figure 19C). Les figures 20A et 20B montrent qu'il n'y a pas de changements significatifs dans l'association protéique et lipidique des lipoprotéines en présence d'un milieu enrichi en apoC-I endogène. Par contre, une inhibition de 25 % ($p<0,05$) de la captation sélective des LDL est observée lorsque le milieu d'incubation est plus concentré en apoC-I endogène (Figure 20C). La dégradation protéique n'a pas été affectée par l'enrichissement de l'apoC-I endogène dans le milieu extracellulaire (Figure 20D).

Dans un deuxième temps, ces deux types de milieux ont été pré-incubés avec des LDL et des HDL_3 pendant 16 heures avant d'être testés pour leur capacité à induire un changement dans le métabolisme des lipoprotéines au niveau des cellules HepG2 (Figure 19D). La figure 21B montre que la pré-incubation du milieu enrichi en apoC-I avec les LDL réduit leur association lipidique aux cellules HepG2 de 17 % ($p<0,05$) sans pour autant affecter la captation sélective des EC des LDL (Figure 21C). L'association et la dégradation protéiques

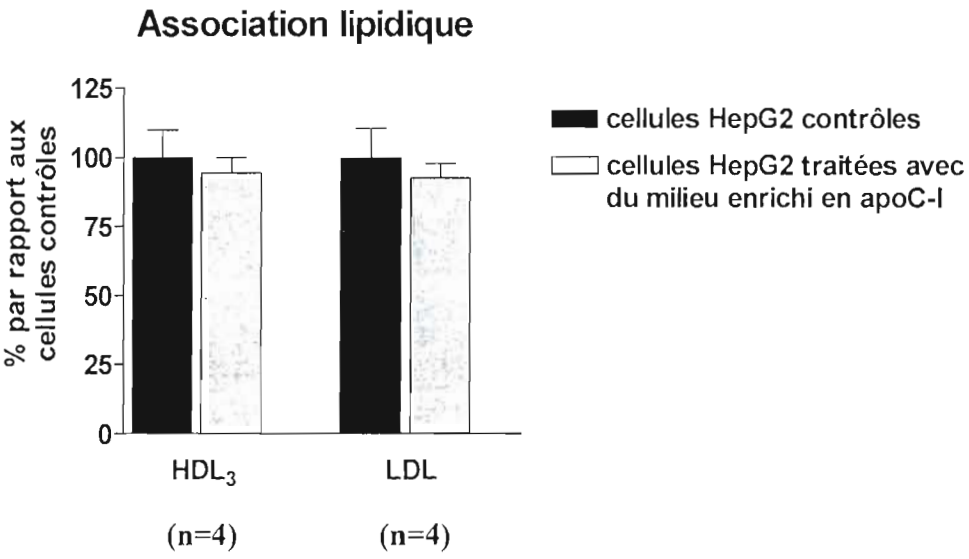
des LDL sont demeurées pratiquement les mêmes en présence de ce milieu enrichi en apoC-I (Figure 21A et 21B). Le métabolisme des HDL_3 ne semble pas affecté par la pré-incubation du milieu enrichi en apoC-I avec les HDL_3, comparativement à celui des cellules contrôles (Figure 21).

Enfin, pour réaliser les tests avec un milieu concentré en apoC-I endogène, les clones sur-exprimant l'apoC-I et les cellules transfectées avec le vecteur vide ont été pré-incubés dans un milieu sans sérum avant de procéder aux essais d'association et de dégradation des lipoprotéines (Figure 19B). La figure 22B montre que les associations lipidiques des LDL et des HDL_3 ont été significativement inhibées ($p<0,05$) de 33 % et de 31 % respectivement dans les cellules sur-exprimant l'apoC-I. Cette inhibition n'affecte pas la captation sélective des lipoprotéines, même si une tendance à la baisse est observée (Figure 22C). L'association et la dégradation protéiques des LDL et des HDL_3 ne diffèrent pas entre les cellules sur-exprimant l'apoC-I et les cellules contrôles (Figure 22A et 22D). Ainsi, les milieux enrichis en apoC-I endogène, suite à une pré-incubation des cellules sur-exprimant l'apoC-I, ont induit une inhibition de l'association lipidique des LDL et des HDL_3 (Figure 22B), et dans certaines conditions, ont provoqué une baisse de la captation sélective des EC des LDL (Figure 20C).

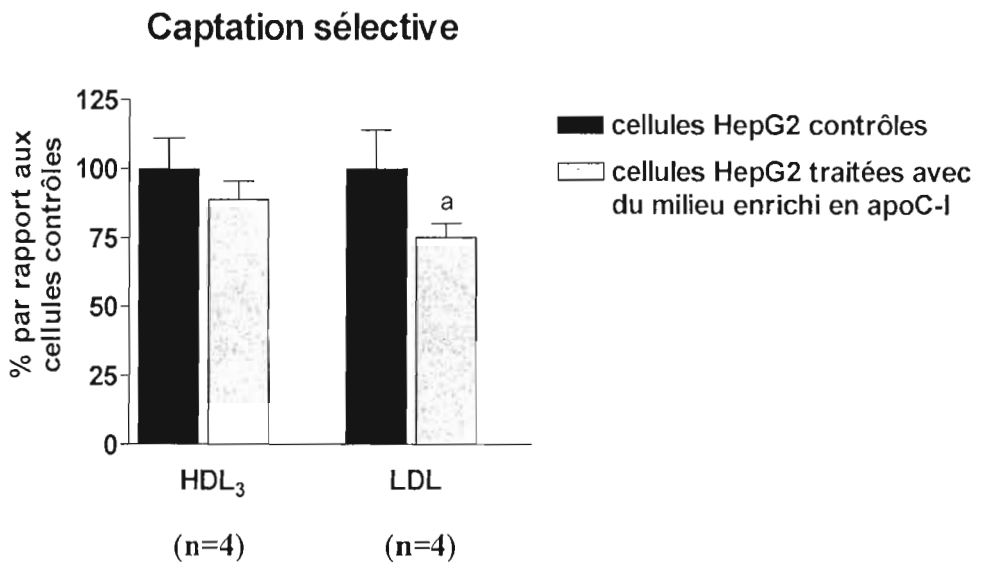
(A)


Association protéique
% par rapport aux cellules contrôles
125
100
75
50
25
0
HDL3
LDL
(n=4)
(n=4)
cellules HepG2 contrôles
cellules HepG2 traitées avec du milieu enrichi en apoC-I

(B)


Association lipidique
% par rapport aux cellules contrôles
125
100
75
50
25
0
HDL3
LDL
(n=4)
(n=4)
cellules HepG2 contrôles
cellules HepG2 traitées avec du milieu enrichi en apoC-I

(C)



(D)

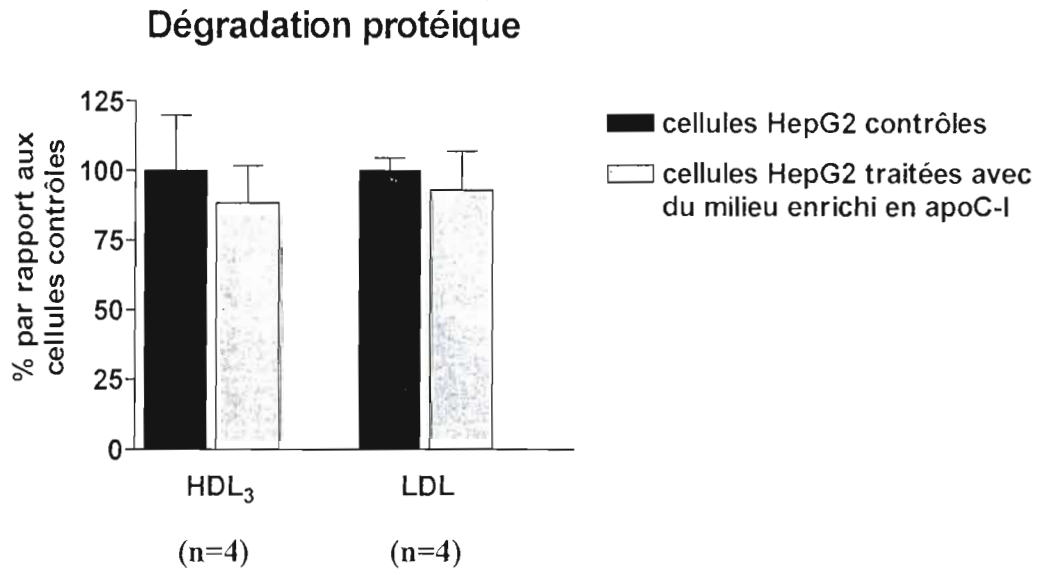
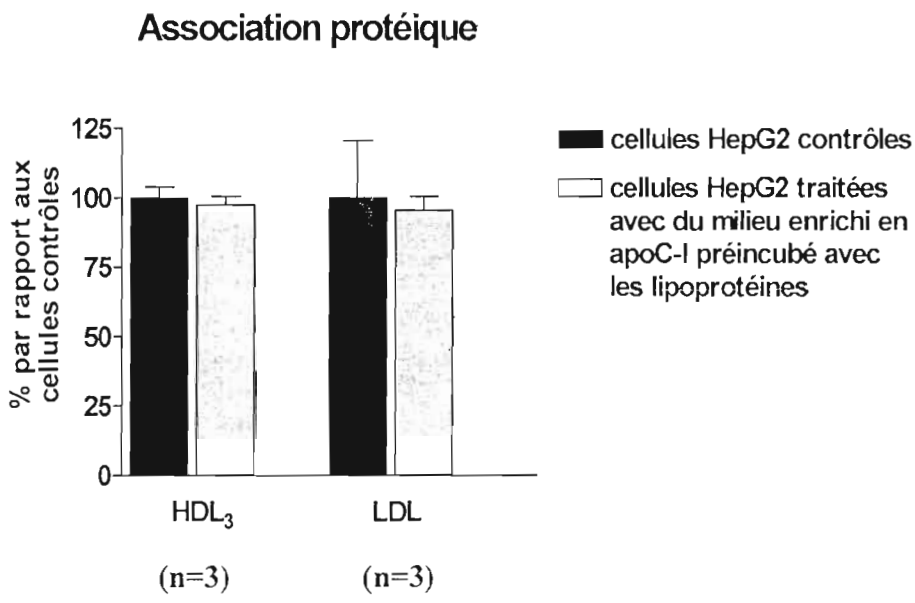


Figure 20 : Effet d'un milieu enrichi en apoC-I sur le métabolisme des LDL et des HDL_3.

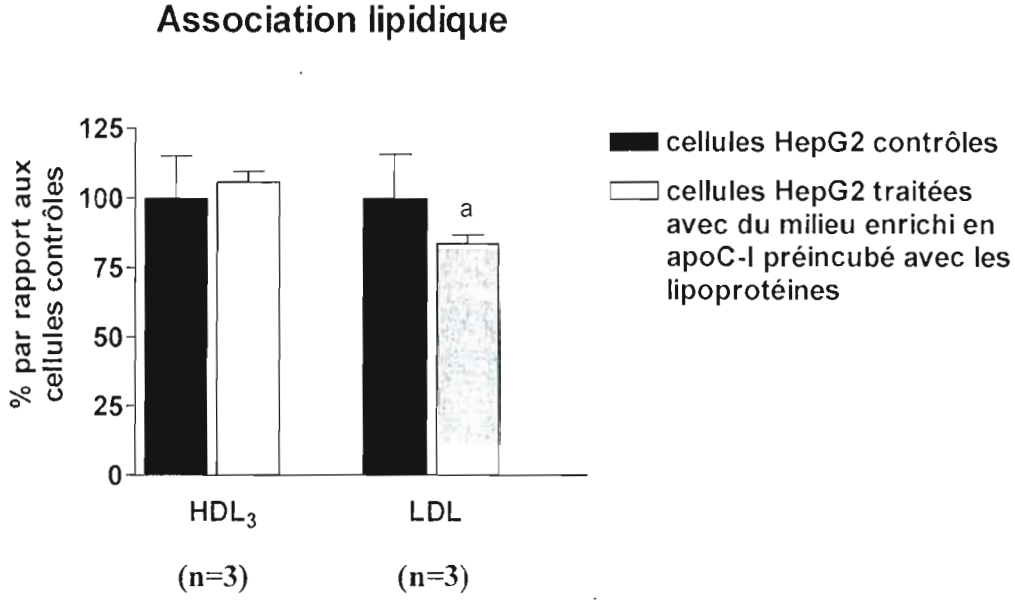
(A) Association des [^{125}I]-LDL et des [^{125}I]-HDL_3; (B) Association des [^{3}H]-EC-LDL et des [^{3}H]-EC-HDL_3; (C) Captation sélective des esters de cholestérol des LDL et des HDL_3; (D) Dégradation des LDL et des HDL_3 par les cellules HepG2 incubées avec du milieu enrichi ou non (contrôle) en apoC-I. Les cellules HepG2 et les cellules HepG2 transfectées avec le vecteur recombinant contenant le gène de l'apoC-I ont été incubées pendant 48 heures dans 500 µl par puits de milieu sans sérum de bœuf fœtal. Les milieux ont été ensuite récoltés, et les essais ont été réalisés sur des cellules HepG2 avec ces milieux.

Chaque valeur représente la moyenne +/- SEM du nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. Les valeurs en µg de protéines/ mg de protéines cellulaires provenant du contrôle ont été établies à 100 %.Les différences statistiques ont été évaluées par un test de T-pairé où [a] statistiquement différent ($p<0,05$) des valeurs obtenues avec les cellules contrôles.

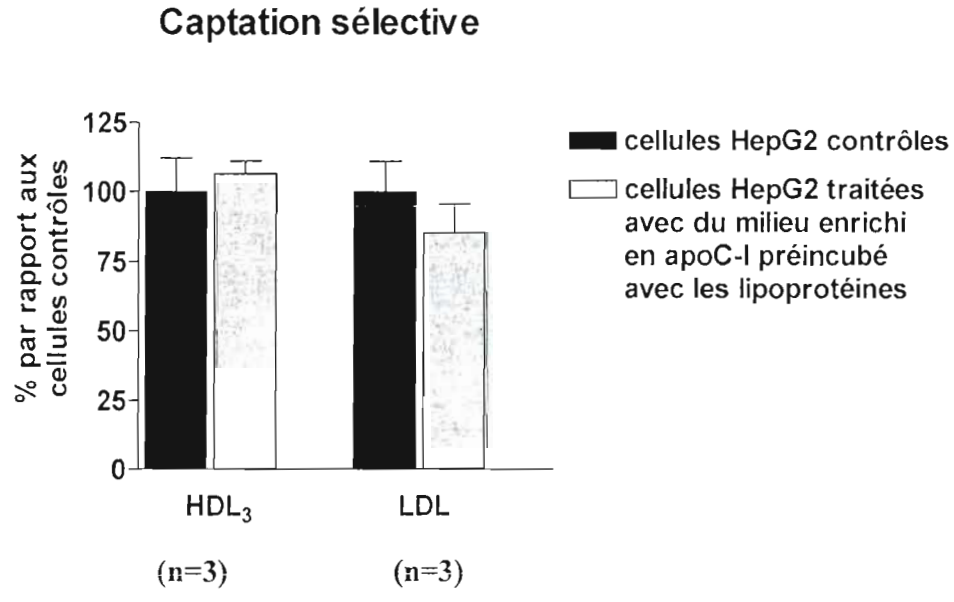
(A)



(B)


Association lipidique
% par rapport aux cellules contrôles
125
100
75
50
25
0
a
HDL3
LDL
(n=3)
(n=3)
cellules HepG2 contrôles
cellules HepG2 traitées avec du milieu enrichi en apoC-I préincubé avec les lipoprotéines

(C)


Captation sélective
% par rapport aux cellules contrôles
125
100
75
50
25
0
HDL3
LDL
(n=3)
(n=3)
cellules HepG2 contrôles
cellules HepG2 traitées avec du milieu enrichi en apoC-I préincubé avec les lipoprotéines

(D)

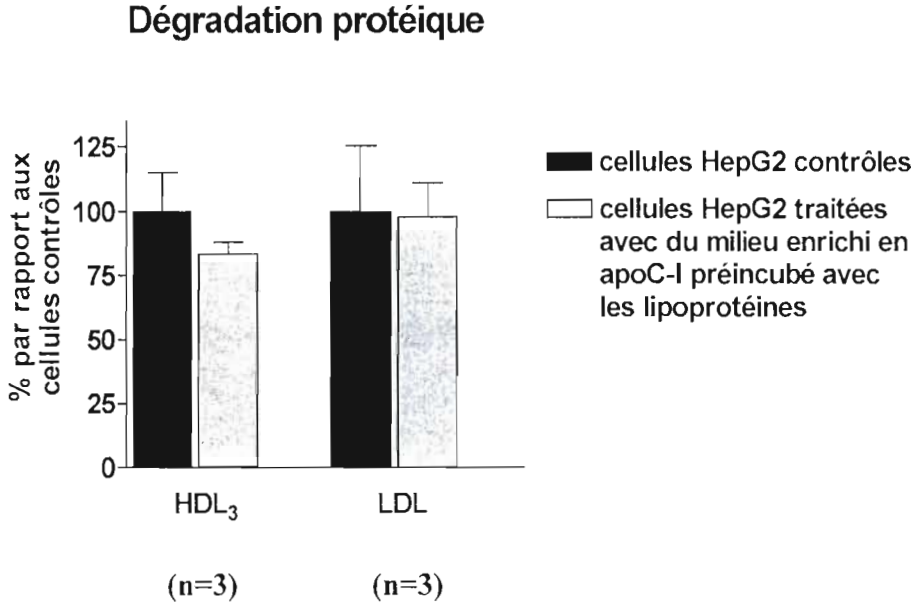
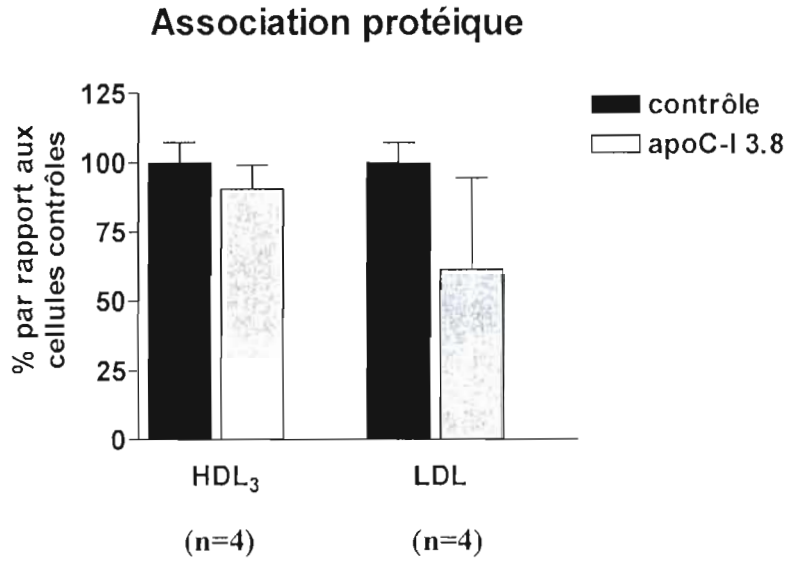


Figure 21 : Effet d'une pré-incubation du milieu enrichi en apoC-I avec les lipoprotéines sur le métabolisme des HDL_3 et des LDL.

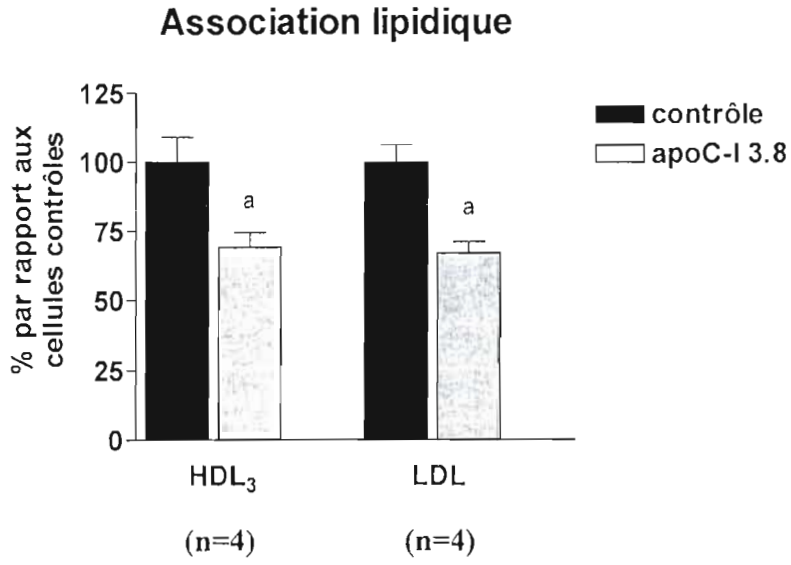
(A) Association des [^{125}I]-LDL et des [^{125}I]-HDL_3; (B) Association des [^{3}H]-EC-LDL et des [^{3}H]-EC-HDL_3; (C) Captation sélective des esters de cholestérol des LDL et des HDL_3; (D) Dégradation des LDL et des HDL_3 par les cellules HepG2 traitées avec du milieu enrichi ou non (contrôle) en apoC-I et pré-incubé avec des lipoprotéines. Les cellules HepG2 et les cellules sur-exprimant l'apoC-I ont été incubées pendant 48 heures dans 500 µl par puits de milieu sans sérum de bœuf fœtal. Les milieux ont été ensuite récoltés et incubés pendant 16 heures à 37° C avec les lipoprotéines. Les essais d'association et de dégradation ont été ensuite réalisés sur des cellules HepG2 avec ces milieux pré-incubés pendant 4 heures à 37° C.

Chaque valeur représente la moyenne +/- SEM du nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. Les valeurs en µg de protéines/ mg de protéines cellulaires provenant des cellules contrôle ont été établies à 100 %. Les différences statistiques ont été évaluées par un test de T-pairé où [a] statistiquement différent ($p<0,05$) des valeurs obtenues avec les cellules contrôles.

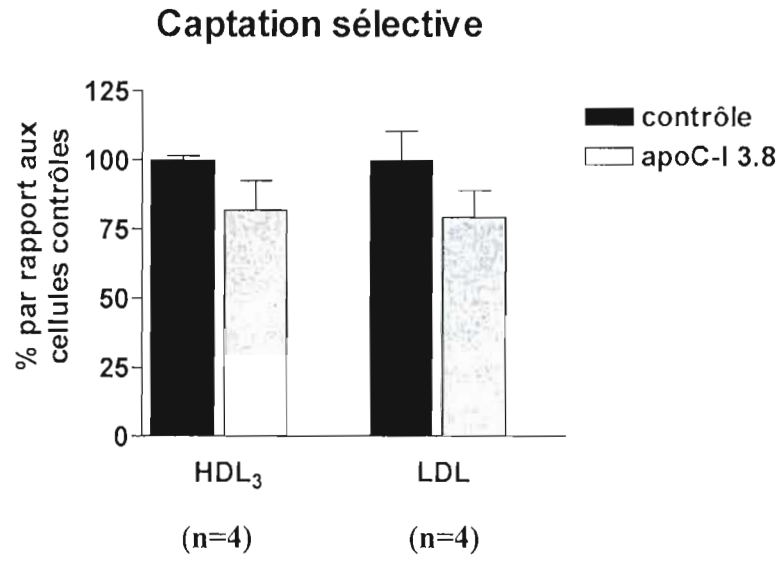
(A)


Association protéique
% par rapport aux cellules contrôles
125
100
75
50
25
0
contrôle
apoC-I 3.8
HDL3
LDL
(n=4)
(n=4)

(B)


Association lipidique
% par rapport aux cellules contrôles
125
100
75
50
25
0
a
a
contrôle
apoC-I 3.8
HDL3
LDL
(n=4)
(n=4)

(C)



(D)

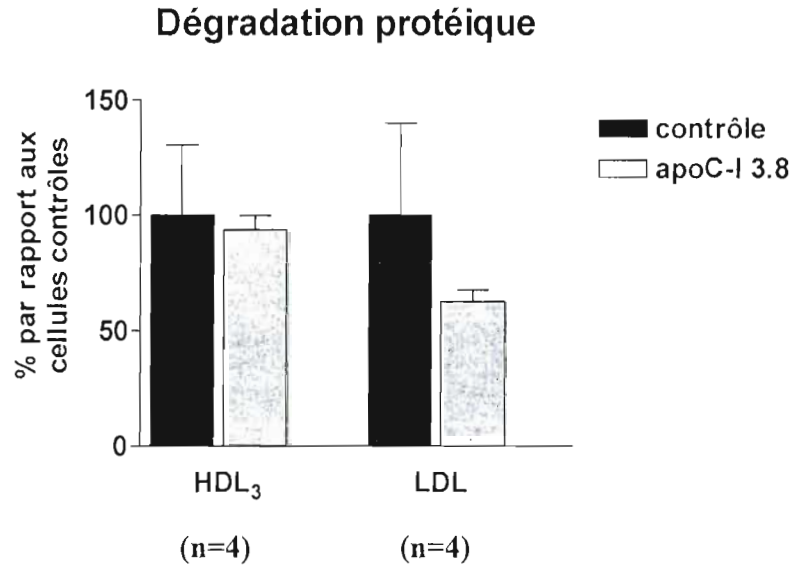


Figure 22 : Effet d'une pré-incubation des cellules sur-exprimant l'apoC-I dans un milieu MEM sans sérum de bœuf fœtal sur le métabolisme des LDL et des HDL_3.

(A) Association des [^{125}I]-LDL et des [^{125}I]-HDL_3; (B) Association des [^{3}H]-EC-LDL et des [^{3}H]-EC-HDL_3; (C) Captation sélective des esters de cholestérol des LDL et des HDL_3; (D)

Dégradation des LDL et des HDL_3 par les cellules HepG2 transfectées avec le vecteur seul (contrôle) et par les cellules HepG2 transfectées avec le vecteur recombinant contenant l'ADNc de l'apoC-I. Les cellules ont été pré-incubées pendant 16 heures avant l'essai dans 300 µl par puits de milieu sans sérum de bœuf foetal. Les essais d'association et de dégradation des lipoprotéines ont été ensuite réalisés.

Chaque valeur représente la moyenne +/- SEM du nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. Les valeurs en µg de protéines/ mg de protéines cellulaires provenant du contrôle ont été établies à 100 %. Les différences statistiques ont été évaluées par un test de T-pairé où [a] statistiquement différent ($p<0,05$) des valeurs obtenues avec les cellules contrôles.

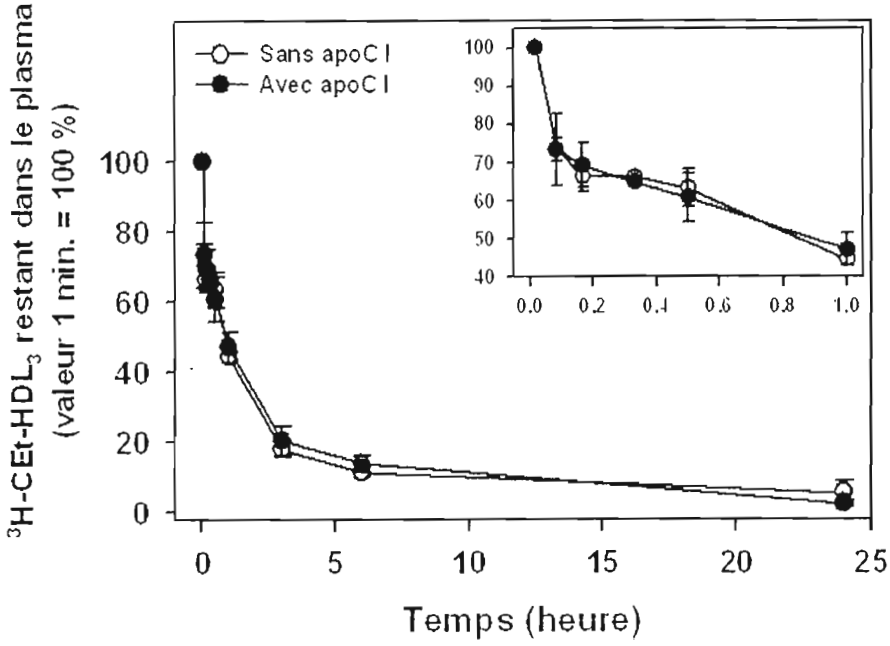
3.8. IMPLICATION DE L'APOC-I DANS LE MÉTABOLISME DES LDL ET DES HDL_3 IN VIVO

3.8.1. Clairances plasmatiques des HDL_3 en présence de l'apoC-I purifiée

Pour mieux comprendre l'implication de l'apoC-I au niveau physiologique dans le métabolisme *in vivo* des HDL_3, des analyses de clairances plasmatiques des HDL_3 marquées ont été réalisées. Les HDL_3 marquées au niveau protéique à l'iode-125 ou au niveau lipidique aux [^{3}H]-CEt, additionnées d'un bolus, et en absence ou en présence d'apoC-I purifiée, ont été injectées à des souris femelles. Des prélèvements sanguins ont ensuite été faits sur une période de 24 heures. La figure 23 montre que la vitesse d'élimination de la partie protéique des HDL_3 est moins rapide que celle de la partie lipidique, ce qui révèle que les HDL_3 sont soumises au phénomène de captation sélective, tel que démontré précédemment (Pittman et Steinberg, 1984). Les clairances plasmatiques des [^{3}H]-CEt-HDL_3 présentent pratiquement le même profil en absence ou en présence d'apoC-I purifiée dans la circulation sanguine (Figure 23A). La vitesse d'élimination de la partie protéique des HDL_3 est aussi similaire, puisqu'on retrouve le même pourcentage de la dose injectée de [^{125}I]-HDL_3 dans le

plasma 3 heures après l'injection dans les deux cas (Figure 23B). Néanmoins, la présence d'apoC-I ralentie légèrement la clairance des [^{125}I]-HDL$_3$, pendant la première heure après l'injection, cette différence étant toutefois non significative.

(A)



(B)

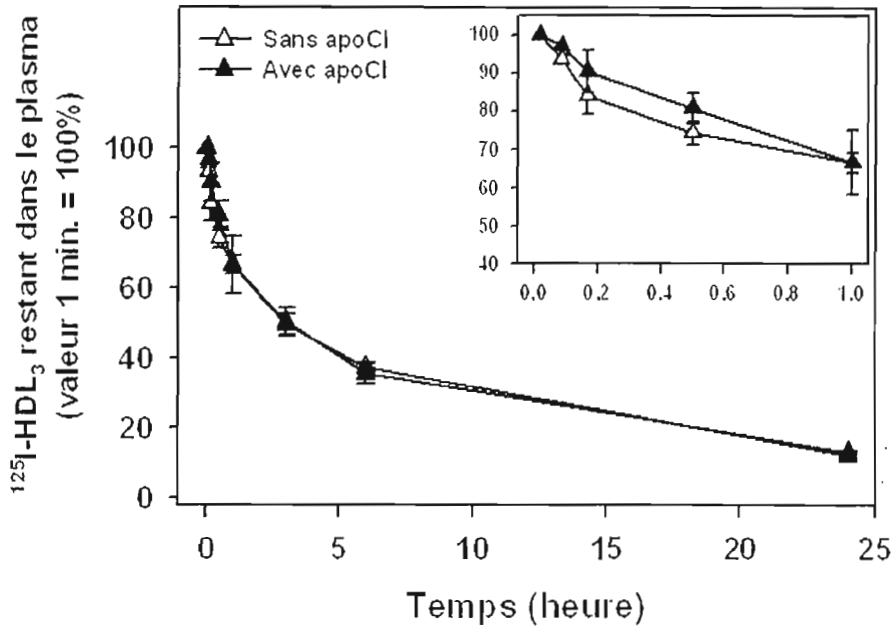


Figure 23 : Clairance plasmatique de [^{3}H]-CEt-HDL$_3$ (A) et [^{125}I]-HDL$_3$ (B) injectées chez des souris femelles en absence ou en présence de 50 µg d'apoC-I.

Vingt µg de lipoprotéines marquées ([^{3}H]-CEt-HDL$_3$ (A) ou [^{125}I]-HDL$_3$ (B)) et 480 µg de bolus de lipoprotéines non marquées avec 0 ou 50 µg d'apoC-I purifiée ont été injectés aux souris par la veine de la queue. Les échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période de 24 heures. Les mesures de la radioactivité restante dans le plasma ont été analysées selon la procédure décrite dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs représentées sont la moyenne +/- SEM de deux expériences.

3.8.2. Clairances plasmatiques des LDL en présence de l'apoC-I purifiée

Les analyses de clairance plasmatique des LDL ont été réalisées sensiblement selon la même procédure que celle utilisée pour analyser les clairances plasmatiques des HDL_3. Les LDL marquées au niveau lipidique au [^{3}H]-CEt, additionnées d'un bolus, et en absence ou en présence de 30 µg d'apoC-I purifiée, ont été injectées à des souris femelles. Des prélèvements sanguins ont ensuite été faits sur une période de 24 heures. Les profils de la vitesse de disparition des [^{3}H]-CEt-LDL sont très similaires en absence ou en présence d'apoC-I purifiée dans la circulation sanguine, malgré qu'une légère tendance au ralentissement de la clairance est observable entre 2 et 5 heures après l'injection (Figure 24). Ainsi, la présence de 30 µg ou de 50 µg d'apoC-I purifiée dans la circulation sanguine n'a pas d'effet notable sur les clairances plasmatiques des LDL et des HDL_3.

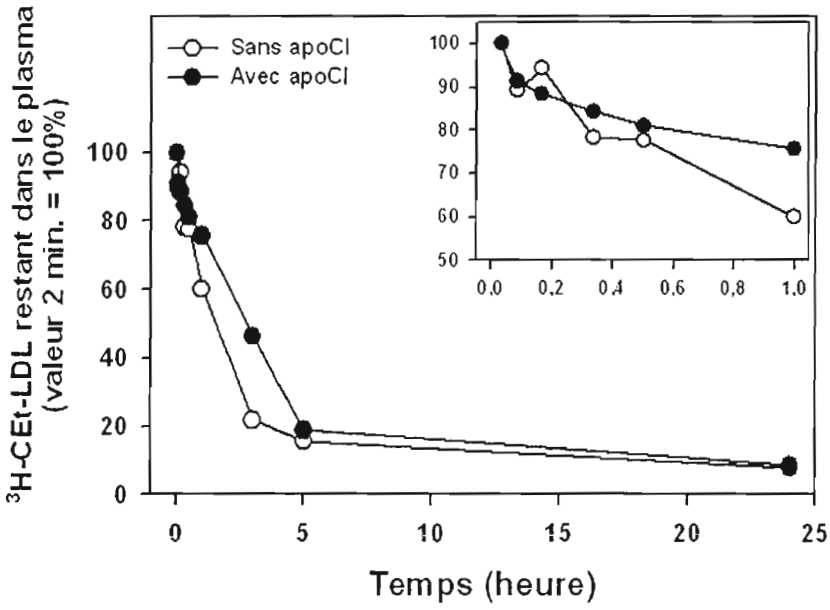


Figure 24 : Clairance plasmatique de [^{3}H]-CEt-LDL injectées chez des souris femelles en absence ou en présence de 30 µg d'apoC-I.

Vingt µg de lipoprotéines marquées ([^{3}H]-CEt-LDL) et 480 µg de bolus de lipoprotéines non marquées avec 0 ou 30 µg d'apoC-I purifiée ont été injectés aux souris par la veine de la queue. Les échantillons sanguins ont été prélevés aux temps indiqués sur une période de 24 heures. Les mesures de la radioactivité restante dans le plasma ont été analysées selon la procédure décrite dans la section Matériel et Méthodes. Les valeurs sont représentatives d'une expérience.

3.8.3. Implication de l'apoC-I dans la clairance des HDL_3 au niveau du foie, des intestins et de l'estomac.

Suite aux analyses de clairances plasmatiques des différentes parties des HDL_3, les animaux ont été sacrifiés et le foie, les intestins et l'estomac ont été prélevés. La figure 25 montre la quantité de [^{125}I]-HDL_3 et de [^{3}H]-CEt-HDL_3 retrouvée dans les différents organes. Chez toutes les souris une plus grande quantité de [^{3}H]-CEt-HDL_3 que de [^{125}I]-HDL_3 a été prise en charge par le foie, ce qui confirme que celui-ci est l'organe cible de la captation sélective des EC provenant de HDL_3, tel que démontré par Pittman et Steinberg (1984). Aucune différence n'est observée dans la prise des [^{125}I]-HDL_3 par les organes des souris ayant reçues ou non de l'apoC-I purifiée. Par contre, la présence de l'apoC-I semble augmenter la prise de la partie lipidique des HDL_3 au niveau hépatique, puisque 48 % ± 5 de la dose injectée est retrouvée dans le foie de ces souris, comparativement au pourcentage (36 % ± 10) retrouvé chez les souris sans apoC-I purifiée dans la circulation. Au niveau des intestins et de l'estomac, l'apoC-I ne semble pas impliquée dans la captation de [^{3}H]-CEt-HDL_3, ce qui pourrait s'expliquer par la faible prise de la partie lipidique des HDL_3 à des sites extra-hépatiques. En somme, ces données indiquent que l'injection de l'apoC-I purifiée dans la circulation sanguine des souris n'affecte pas le métabolisme *in vivo* des LDL et des HDL_3, contrairement à son ajout dans le milieu de culture des cellules HepG2 (Figure 4).

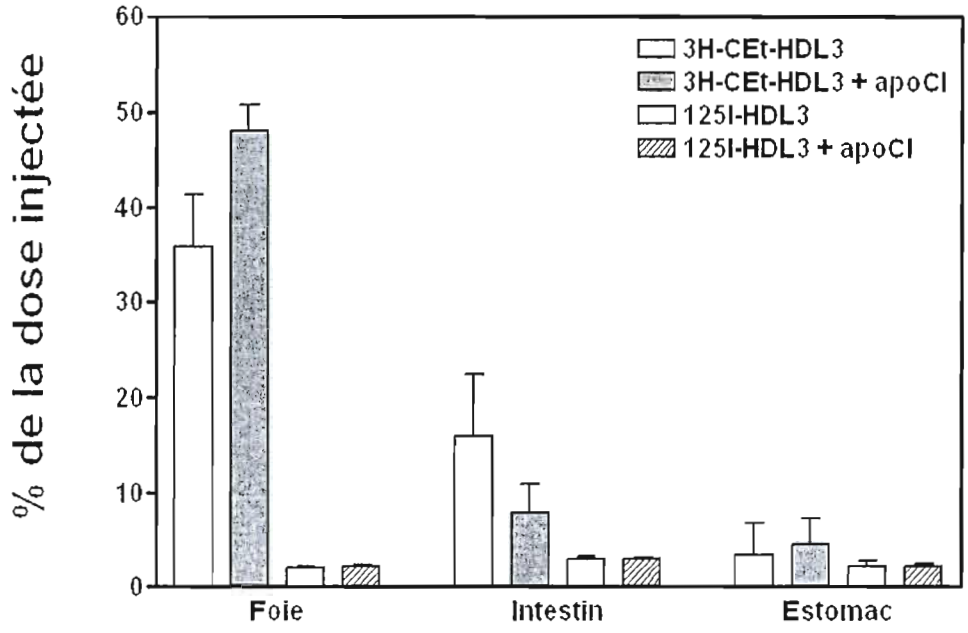


Figure 25 : Implication de l'apoC-I dans la clairance des [^{3}H]-CEt-HDL$_3$ et [^{125}I]-HDL$_3$ chez des souris femelles.

Vingt µg de lipoprotéines marquées ([^{3}H]-CEt-HDL$_3$ ou [^{125}I]-HDL$_3$) et 480 µg de bolus de lipoprotéines non marquées avec 0 ou 50 µg d'apoC-I purifiée ont été injectés aux souris par la veine de la queue. Des analyses de clairances plasmatiques ont été réalisées sur une période de 24 heures et les organes des animaux ont été prélevés. Les mesures de radioactivité dans les organes ont été réalisées suivant la procédure décrite dans la section Matériel et Méthodes.

3.9. LIAISON DE L'APOC-I PURIFIÉE AUX CELLULES HepG2 ET AUX LIPOPROTÉINES

Afin d'élucider le mécanisme par lequel l'apoC-I purifiée inhibe de la captation sélective des EC des LDL et des HDL_3, dans un premier temps des essais de liaison de l'[^{125}I]-apoC-I sur des cellules HepG2 ont été réalisés. Les expériences ont été effectuées à 4° C pour éviter l'internalisation et la dégradation éventuelles de l'[^{125}I]-apoC-I. La figure 26 montre que l'[^{125}I]-apoC-I se lie de manière spécifique aux cellules HepG2 (B_{max} = 0,23 ± 0,05 µg/mg de protéines cellulaires; K_d = 32,7 ± 10,6 µg/ml). De plus, le graphique de Scatchard révèle une droite suggérant un seul site de liaison pour l'apoC-I sur les cellules HepG2 ou de sites ayant la même affinité.

L'association de l'[^{125}I]-apoC-I aux LDL et aux HDL_3 a été aussi analysée. Les LDL ou les HDL_3 à 20 µg/ml ont été incubées en présence de l'[^{125}I]-apoC-I à 2,5 µg/ml pendant 4 heures à 37° C. Ces concentrations ont été choisies afin de reproduire les conditions des essais d'association des lipoprotéines à partir desquelles une diminution significative de la captation sélective des EC a été observée (Figure 4C). Les LDL et les HDL_3 ont subi ensuite une migration sur gel NDGGE, puis le gel a été révélé par autoradiographie. La figure 27 démontre que l'[^{125}I]-apoC-I est associée aux LDL et aux HDL_3 dans ces conditions d'incubation. Ainsi, l'apoC-I purifiée se lie de manière spécifique à la membrane des cellules HepG2, et s'associe aux LDL et aux HDL_3.

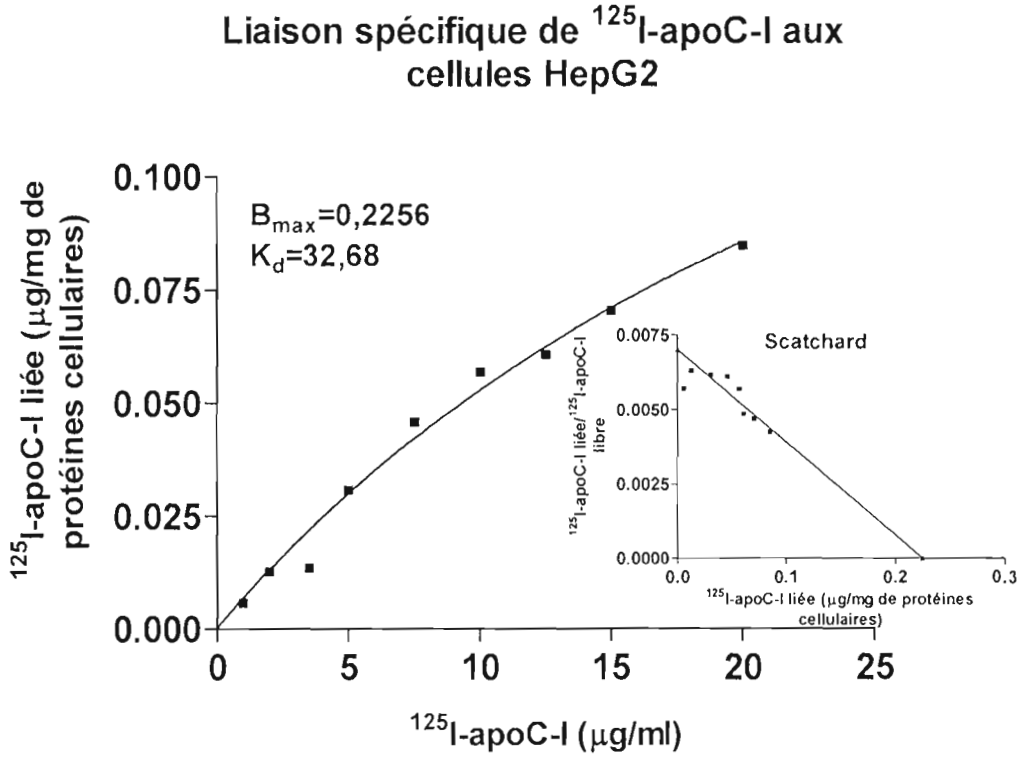


Figure 26 : Liaison spécifique de [^{125}I]-apoC-I aux cellules HepG2.

Courbe de saturation et graphique de Scathcard de la liaison spécifique de [^{125}I]-apoC-I aux cellules HepG2. La liaison totale et la liaison non spécifique de l'apoC-I marquée à l'iode à ces cellules a été mesurées suivant le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes. La liaison spécifique a été calculée en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale. Chaque valeur présente la moyenne de deux expériences réalisées en duplicata.

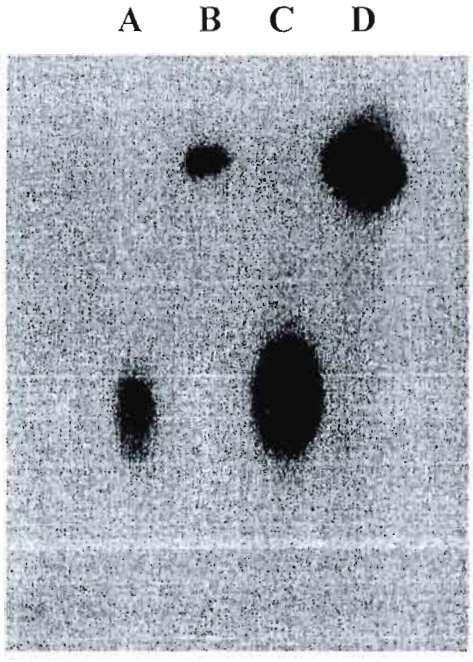


Figure 27 : Autoradiographie de la migration des LDL et des HDL_3 incubées pendant 4 heures à 37° C en présence de 2,5 µg/ml de [^{125}I]-apoC-I.

Cinq milles cpm de [^{125}I]- HDL_3 (A) et de [^{125}I]- LDL (B), et vingt-cinq milles cpm de HDL_3 (C) et de LDL (D) incubées avec de l'apoC-I marquée à l'iode-125 ont été déposés sur gel NDGGE. Le gel a été ensuite solidifié, puis séché selon la méthode décrite dans la section Matériel et Méthodes et exposé sur film Kodak durant 15 heures à -80°C.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La présente étude avait pour objectif d'éclaircir le rôle de l'apoC-I dans le métabolisme des LDL et des HDL_3 par les cellules HepG2. En effet, des études antérieures ont démontré que l'apoC-I inhibe la captation des lipoprotéines riches en triglycérides par la LRP, le rLDL ou le récepteur des VLDL. Cependant aucune étude portant sur la captation sélective des esters de cholestérol des LDL et des HDL_3 n'a été publiée à ce jour. Or, le cholestérol, tout comme les triglycérides, est en partie responsable des troubles associés aux maladies cardiovasculaires. Il s'avère donc important de connaître chaque composante impliquée dans le métabolisme de ce lipide.

4.1. Effet de l'apoC-I purifiée sur le métabolisme des LDL par les cellules HepG2

Les résultats de type « exogène » obtenus avec de l'apoC-I purifiée additionnée au milieu extracellulaire, ont révélé une diminution dose dépendante de l'association lipidique et de la captation sélective des EC des LDL (Figure 4B et 4C). L'association et la dégradation de la portion protéique des LDL n'ont pas été affectées par la présence de l'apoC-I, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Sehayek et Eisenberg (1991) et en contradiction avec l'étude de Clavey et al. (1995) qui a démontré une inhibition partielle de la dégradation des LDL. Les conditions expérimentales pourraient expliquer cette différence. En effet nos essais

de dégradation ont été effectués avec 5 µg/ml d'apoC-I, ce qui représente un ratio molaire apoC-I :apoB de 12 :1, tandis que ceux de Clavey et al. (1995) ont été réalisés avec un ratio de 30 :1.

Pour expliquer l'effet de l'apoC-I purifiée sur la captation sélective des EC des LDL, nous avons réalisé des expériences visant à déterminer si l'apoC-I était apte à s'associer aux cellules HepG2 et/ou aux lipoprotéines. D'une part, les essais de liaison de l'[^{125}I]-apoC-I sur des cellules HepG2 (Figure 26) ont démontré que l'apoC-I se lie de manière spécifique à la membrane de ces cellules. Étant donné la présence d'hélices α-amphipatiques dans la structure de l'apoC-I et les résultats démontrant que ces structures favorisent l'association au SR-BI (Xu et al., 1997), une liaison de cette apolipoprotéine au SR-BI est à prévoir, et cela d'autant plus que l'apoC-III a déjà été définie comme un ligand de SR-BI (Xu et al., 1997). De plus, l'apoC-I se lie aux cellules HepG2 (K_d = 32,7 µg/ml) avec une affinité proche de celle des LDL (K_d = 43,4 µg/ml) et des HDL_3 (K_d = 50,1 µg/ml) (Charpentier et al., 2000). L'apoC-I étant fort probablement un ligand de SR-BI tout comme la LDL, deux effets de l'apoC-I peuvent être suggérés. En effet, soit l'apoC-I réduit la liaison des LDL aux SR-BI par simple compétition et en conséquence diminue la captation sélective; en d'autres mots, que l'apoC-I et les LDL se lient au même site de liaison sur le SR-BI ; soit l'apoC-I en se liant au SR-BI modifie la structure de ce dernier et le rend moins performant pour exercer sa fonction de captation sélective. Dans ce cas-ci, il faut postuler que le site de liaison de l'apoC-I sur le SR-BI est différent de celui des LDL. Ceci est d'autant plus possible qu'il est déjà connu que le SR-BI présente des sites de liaison différents pour les LDL et HDL (Gu, Lawrence et Krieger, 2000), et des sites de liaison multiples pour les apolipoprotéines (Thuahnai et al., 2003). Puisque nous n'avons pas observé une diminution de l'association protéique des LDL en présence d'apoC-I, la première possibilité est rejetée. Pour tester la deuxième possibilité, notamment pour vérifier que l'apoC-I est un ligand de SR-BI, des essais de liaison de l'[^{125}I]-apoC-I aux cellules HepG2 normales et aux cellules HepG2 sur-exprimant le SR-BI qui ont été générées par notre groupe (Rhainds et al., 2004) pourront être effectués. Dans le cas d'une réelle association de l'apoC-I avec le SR-BI, la capacité

maximale de liaison (B_{max}) devrait augmenter dans les essais réalisés avec des cellules sur-exprimant le SR-BI.

De plus, puisque le SR-BI est le récepteur responsable de la majorité de la captation sélective des esters de cholestérol par les cellules HepG2 (Rhainds et al., 2003), la présence de l'apoC-I dans le milieu pourrait réduire son expression, et en conséquence le taux de captation sélective des EC. Afin de vérifier cette probabilité, le niveau d'expression du SR-BI dans des cellules incubées avec de l'apoC-I (5 µg/ml) devrait être comparé à celui des cellules n'ayant pas été incubées avec de l'apoC-I. La liaison de l'apoC-I libre au CD36 est aussi à considérer, étant donné la structure similaire des domaines extra cytoplasmiques du SR-BI et du CD36 (Greenwalt et al., 1992). Or, cette possibilité est à rejeter car Rhainds et al. (2003) ont démontré que le CD36 n'est pas responsable de la captation sélective des EC des LDL dans les cellules HepG2.

Comme le démontrent nos résultats de la figure 27, l'apoC-I libre peut s'associer également aux LDL. Les essais d'incubation de l'[^{125}I]-apoC-I aux lipoprotéines étant réalisés dans les mêmes conditions que les essais d'association des LDL aux cellules HepG2, on pourrait considérer que l'apoC-I liée aux LDL réduit la capacité des lipoprotéines à interagir avec les récepteurs membranaires. En effet, il a été démontré que l'apoC-I peut interagir spécifiquement avec l'apoE et empêcher l'interaction de celle-ci au rLDL (Sehayek et Eisenberg, 1991). Il est à noter, que bien que les LDL que nous avons utilisées ne contiennent pas d'apoE, il est possible qu'elles en acquièrent suite à la production d'apoE par les cellules HepG2 (Lilly-Stauderman et al., 1993). Cette probabilité est toutefois à rejeter, car aucune baisse de l'association protéique des LDL n'a été observée en présence de l'apoC-I purifiée. On ne peut toutefois pas éliminer la possibilité que l'apoC-I en s'associant aux LDL fasse en sorte que ces dernières deviennent de moins bon donneurs d'EC. Pour vérifier ceci, il serait approprié d'incuber avec de l'apoC-I des LDL marquées dans leurs fractions protéique et lipidique, de les ré-isoler afin de se débarrasser de l'apoC-I libre et de comparer les potentiels en captation sélective de ces lipoprotéines enrichies en apoC-I par rapport à ceux des LDL contrôles.

4.2. Effet de l'apoC-I purifiée sur le métabolisme des HDL_3 par les cellules HepG2

Les études d'association et de dégradation des HDL_3 ont montré des résultats similaires à ceux obtenus avec les LDL. En effet, l'apoC-I purifiée inhibe de manière dose dépendante l'association lipidique et la captation sélective des EC à partir des HDL_3 (Figure 4B et 4C). L'effet de l'apoC-I est pourtant statistiquement plus marqué pour l'association lipidique de HDL_3 comparativement à celle des LDL, puisqu'une perte significative a été observée dès l'ajout de 2,5 µg/ml d'apoC-I libre. Entre autres, la baisse de la captation sélective des EC en présence d'apoC-I purifiée ne pourrait s'expliquer avec une altération de la voie de captation globale, car aucune différence significative dans l'association et la dégradation protéiques des HDL_3 n'a été observée. De plus les résultats de la figure 27 ont révélé que l'apoC-I purifiée peut s'incorporer à la surface des HDL_3, tel que démontré par Malmendier et al. (1986). Les mêmes hypothèses émises pour les LDL pourraient être avancées ici pour expliquer la diminution de captation sélective, mais dans ce cas-ci un effet sur l'association au CD36 ne peut être éliminé.

4.3. Impact de la présence endogène de l'apoC-I sur le métabolisme des LDL

Pour définir si l'expression d'apoC-I par les cellules hépatiques peut moduler leur capacité à retirer les EC des LDL, des cellules HepG2 secrétant différents niveaux d'apoC-I ont été obtenues. Les cellules sur-exprimant l'apoC-I ont été générées avec un vecteur d'expression contenant l'ADNc de l'apoC-I. L'inhibition de l'expression de l'apoC-I par les cellules HepG2 a été obtenue par la stratégie des siRNA. Aucune modulation du métabolisme des LDL n'a été détectée avec les transformants sur-exprimant l'apoC-I (Figure 15). Les analyses des niveaux d'expression des récepteurs (SR-BI, rLDL et CD36) par ces cellules ont montré une augmentation du niveau d'expression de SR-BI (Figure 17). Ainsi, il est possible que les

valeurs obtenues pour la captation sélective des EC des LDL par les cellules sur-exprimant l'apoC-I soient sur-estimées à cause de cette augmentation. Alternativement, le manque d'effet pourrait être attribué à un niveau d'expression insuffisant d'apoC-I, puisque les cellules sur-exprimant l'apoC-I produisent 180 ng/ml d'apoC-I durant les essais d'association, ce qui ne représente que 7 % de la première concentration d'apoC-I purifiée à partir de laquelle un effet sur le métabolisme des LDL a été observé (Figure 4C). Ainsi, afin de détecter un effet de l'apoC-I endogène et éviter l'impact d'une augmentation de l'expression du SR-BI, les essais métaboliques ont été réalisés avec du milieu concentré en apoC-I endogène (Figure 19). Les résultats obtenus ont démontré que, dans les cellules HepG2, le milieu enrichi en apoC-I provoque une diminution de 25% de la captation sélective des EC des LDL (Figure 20C). Contrairement aux essais précédents de type « endogène », cette observation pourrait s'expliquer avec le niveau d'expression du SR-BI restant stable dans les cellules HepG2, ce qui permet de détecter un effet de l'apoC-I endogène. Lorsque les clones sur-exprimant l'apoC-I ont été pré-incubés dans du milieu sans sérum avant l'essai, l'association de la portion lipidique des LDL a été significativement inhibée de 33% (Figure 22B). Sachant que l'apoC-I se lie aux cellules de manière spécifique (Figure 26), il est possible que l'apoC-I se lie au récepteur responsable du transfert lipidique des LDL, le SR-BI, en modifiant sa conformation. Les mêmes résultats ont été constatés lorsque le milieu concentré en apoC-I a été pré-incubé avec les LDL avant l'essai (Figure 21C). On peut attribuer cet effet à un enrichissement des LDL en apoC-I secrétée par les cellules, ce qui modifierait la capacité des lipoprotéines à décharger leurs EC aux cellules. Pour savoir si l'apoC-I endogène peut s'associer aussi bien que l'apoC-I purifiée aux LDL, les lipoprotéines pourraient être incubées sans ou avec le milieu concentré en apoC-I, puis isolées par ultracentrifugation en ajustant la densité à 1,063 g/ml, avant de mesurer et comparer la concentration en apoC-I par ELISA.

Les résultats obtenus avec les cellules sous-exprimant l'apoC-I ont démontré une augmentation de l'association lipidique et protéique des LDL (Figure 16). L'effet inhibiteur d'apoC-I peut s'expliquer soit par une activation des récepteurs, soit par la stimulation des voies indépendantes du SR-BI et du rLDL. En effet, Ji et al. (1994) ont révélé que la

sécrétion de l'apoE par les cellules hépatiques accentue la liaison et la captation des β-VLDL, un effet qu'ils accordent à la LRP. D'autre part, Swarnakar et al. (2001) ont démontré que l'apoE secrétée par des cellules adrénocorticales peut médier la captation sélective des EC des LDL par une voie indépendante du SR-BI, impliquant probablement la LRP. Puisque nous n'avons observé aucune modulation du niveau d'expression des récepteurs (SR-BI, rLDL et CD36) (Figure 18), la première hypothèse est rejetée. Pour tester la deuxième possibilité, notamment pour vérifier si l'apoE est impliquée dans l'augmentation de l'association des LDL aux cellules HepG2, le niveau de sécrétion de l'apoE devrait être comparé entre les cellules sous-exprimant l'apoC-I et les cellules contrôles. Ainsi, ce résultat suggère que le niveau normal endogène de l'apoC-I inhibe partiellement l'association des LDL aux cellules hépatiques et qu'une modulation de la synthèse/sécrétion d'apoC-I pourrait activer le métabolisme des LDL par ces cellules.

4.4. Impact de la présence endogène de l'apoC-I sur le métabolisme des HDL_3

Les essais de type « endogène » visant à définir l'impact de l'apoC-I sécrétée par les cellules hépatiques sur le métabolisme des HDL_3 n'ont pas donné les résultats escomptés. Cette observation pourrait s'expliquer avec les mêmes hypothèses formulées dans la section précédente concernant les LDL. Ainsi, pour détecter un effet de l'apoC-I endogène, les essais métaboliques ont été réalisés avec les HDL_3 en présence d'un milieu concentré en apoC-I (Figure 19). Les résultats ont montré une diminution de l'association lipidique des HDL_3 lorsque les clones sur-exprimant l'apoC-I ont été pré-incubés dans un milieu sans sérum pendant 16 heures avant l'essai (Figure 22B). Étant donné que l'apoC-I se fixe fort probablement à un seul récepteur sur les cellules HepG2 puisque le graphique de Scatchard a révélé une droite (Figure 26) et qu'elle inhibe à la fois l'association lipidique des LDL et des HDL_3, on peut suggérer qu'il s'agit d'un seul récepteur impliqué dans le transfert lipidique des deux lipoprotéines. Contrairement aux résultats obtenus avec les LDL, la pré-incubation du milieu enrichi en apoC-I avec les HDL_3 n'a pas eu d'effet sur le métabolisme de ces

dernières (Figure 21). Ainsi, d'une part, l'apoC-I endogène pourrait se lier aux récepteurs des LDL et des HDL_3, en provoquant une baisse de l'association lipidique des lipoprotéines, et d'autre part, elle pourrait interagir avec les LDL et les HDL_3, en diminuant la capacité des LDL à délivrer leur EC aux cellules hépatiques.

En ce qui concerne le métabolisme des HDL_3 par les cellules sous-exprimant l'apoC-I, les résultats ont démontré une augmentation de la captation sélective des EC (Figure 16). Ceci ne peut pas être attribué à des niveaux plus élevés du SR-BI ou du CD36, puisque leurs niveaux d'expression sont restés les mêmes dans les différents types cellulaires (Figure 18). Par ailleurs, l'effet de l'inhibition de l'expression d'apoC-I pourrait s'expliquer par la stimulation d'une voie indépendante du SR-BI. En effet, il a été démontré que la LH peut médier la captation sélective des EC des HDL_3, indépendamment du SR-BI (Brundert et al., 2003). De plus, Vassiliou et al. (2001) ont démontré que, dans les adipocytes, la LRP par l'intermédiaire de l'apoE, participe à la captation sélective des EC de ces lipoprotéines. Pour tester cette hypothèse les niveaux d'expression de la LH, de la LRP et de l'apoE devraient être comparés entre les cellules sous-exprimant l'apoC-I et les cellules contrôles. Enfin, l'augmentation de la captation sélective des EC par les cellules sous-exprimant l'apoC-I suggère que l'expression normale endogène de l'apoC-I inhibe la voie de captation sélective des EC des HDL_3.

4.5. Étude in vivo de l'effet de l'apoC-I sur le métabolisme des LDL et HDL

Contrairement aux résultats obtenus avec les essais *in vitro*, nos travaux *in vivo* par l'injection d'apoC-I n'ont pas révélé d'effet de cette apolipoprotéine dans le métabolisme des LDL et des HDL_3. Ce résultat reste surprenant étant donné que les souris transgéniques en apoC-I sont hyperlipidémiques (Jong et al., 1996b) et manifestent une forte diminution de la clairance des VLDL riches en TG (Jong et al., 1996a; Shachter et al., 1996). De plus, l'apoC-I inhibe le remodelage des HDL médié par la LH (Shinomiya et al., 1982), un mécanisme

favorisant la captation des EC à partir des HDL via le SR-BI (Thuren, 2000). Les conditions expérimentales pourraient expliquer cet échec : en effet, la production endogène d'apoC-I n'étant pas connue, nous avons utilisé 50 µg d'apoC-I purifiée, ce qui pourrait être insuffisant pour tester l'effet de cette apolipoprotéine *in vivo*. De plus, pour vérifier si l'apoC-I purifiée peut aussi s'associer avec les lipoprotéines *in vivo*, l'[^{125}I]-apoC-I pourrait être injectée à des souris en présence des HDL_3 et des LDL humaines, les lipoprotéines seraient ensuite isolées du plasma par ultracentrifugation, et mises sur gel NDGGE. Le foie de ces souris pourrait être prélevé pour mesurer la radioactivité, ce qui pourrait être un indice de liaison de l'[^{125}I]-apoC-I aux cellules hépatiques *in vivo*. En somme, il est possible que la forme sous laquelle l'apoC-I se présente détermine son mode d'action.

4.6. Effet physiologique potentiel de l'apoC-I et interventions thérapeutiques possibles dans le traitement des hypercholestérolémies

Notre équipe a démontré que l'apoC-II et l'apoC-III ont des effets sur le métabolisme des LDL et HDL_3 comparables à celui que nous avons démontré pour l'apoC-I (Huard et al., 2005). À l'opposé, l'apoE favorise la captation sélective des LDL et des HDL_3, tel que démontré par Charpentier et al. (2000). En somme, les effets observés dépendent du type d'apolipoprotéine, les apoCs et l'apoE jouant des rôles opposés dans le métabolisme des LDL et des HDL_3, deux classes de lipoprotéines impliquées dans le développement de l'athérosclérose.

Ainsi, étant donné que l'apoC-I diminue de façon très importante le métabolisme des HDL_3, laissant derrière un niveau plus élevé en HDL_3, on peut considérer qu'elle est anti-athérogénique. D'autre part, la diminution de la captation sélective des EC à partir des HDL_3 peut être interprétée comme pro-athérogénique car les HDL-cholestérol sont moins aptes à s'associer au cholestérol cellulaire et en conséquence à participer au transport inverse du cholestérol. En ce qui concerne la réduction de la captation sélective à partir des LDL, elle est

difficilement interprétable. En effet, la captation sélective peut être bénéfique en diminuant le niveau des LDL-cholestérol, mais elle génère théoriquement également des LDL plus petites et plus denses qui sont hautement athérogéniques (Galeano et al., 1998). D'autres études sont nécessaires avant de s'assurer que la baisse de l'apoC-I est bénéfique pour le métabolisme des LDL et des HDL_3.

CONCLUSION

En conclusion, cette étude a démontré que l'apoC-I inhibe l'association lipidique et la captation sélective des EC des LDL et des HDL_3 par les cellules HepG2. Cette diminution ne peut s'expliquer par une baisse du nombre des récepteurs, mais plutôt par une altération dans l'interaction entre les lipoprotéines et leurs récepteurs. Une telle hypothèse peut être supportée par des études montrant que l'apoC-I inhibe la clairance des lipoprotéines riches en TG en modifiant leur interaction avec le rLDL, rVLDL et la LRP. Le projet présenté a aussi révélé que l'apoC-I peut se lier aux cellules HepG2 et qu'elle peut s'associer également aux LDL et aux HDL_3. Ainsi, la diminution de la captation sélective des EC des LDL et des HDL_3 en présence de l'apoC-I pourrait être due à un mécanisme complexe impliquant des interactions de celle-ci à la fois à la membrane plasmique des cellules et aux lipoprotéines. D'autres expériences sont nécessaires pour définir si le changement de la structure du SR-BI, et/ou la modification de la capacité des lipoprotéines à délivrer leur EC, sont/est responsable(s) pour l'effet observé.

BIBLIOGRAPHIE

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., et Krieger, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271: 518-20.

Acton, S.L., Scherer, P.E., Lodish, H.F., et Krieger, M. 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. J. Biol. Chem. 269: 21003-9.

Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., et Knowles, B.B. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature 282: 615-6.

Alaupovic, P. 1972. Dans Proceedings of the XIXth Annual Colloquium on protides of the biological fluids. Pergamon Press, New York.

Alaupovic, P., Knight-Gibson, C., Wang, C.S., Downs, D., Koren, E., Brewer, H.B. Jr., et Gregg, R.E. 1991. Isolation and caracterization of an apoA-II-containing lipoprotein (LP-A-II:B complex) from plasma very low density lipoproteins of a patients with Tangier disease and type V hyperlipoproteinemia. J. Lipid Res. 32: 9-19.

Allan, C.M., Taylor, S., et Taylor, J.M. 1997. Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coordinate the liver expression of the entire human apolipoprotein E/C-I/C-IV/CII gene cluster. J. Biol. Chem. 272: 29113–9.

Allan, C.M., Walker, D., et Taylor, J.M. 1995. Evolutionary duplication of a hepatic control region in the human apolipoprotein E locus: identification of a second region that confers high level and liver-specific expression of the human apolipoprotein E gene in transgenic mice. J. Biol. Chem. 270: 26278–81.

Anderson, R.G., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1977. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. Nature 270: 695-9.

Armesilla, A.L., et Vega. M.A. 1994. Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. J Biol. Chem. 269: 18985-91.

Assmann, G. 1982. Lipid metabolism and atherosclerosis. F.K. Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart. Germany.

Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G., Xu, S., et Krieger, M. 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. J. Biol. Chem. 272: 13242-9.

Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G., Xu, S., et Krieger. M. 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. J. Biol. Chem. 272: 13242-9.

Barter, P., Kastelein, J., Nunn, A., et Hobbs, R. Future Forum Editorial Board. 2003. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. Atherosclerosis 168: 195-211.

Barter, P.J., Rajaram, O.V., Chang, L.B., Rye, K.A., Gambert, P., Lagrost, L., Ehnholm, C., et Fidge, N.H. 1988. Isolation of a high-density-lipoprotein conversion factor from human plasma. A possible role of apolipoprotein A-IV as its activator. Biochem. J. 254: 179-84.

Beisiegel, U., Schneider, W.J., Goldstein, J.L., Anderson, R.G., et Brown, M.S. 1981. Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia. J. Biol. Chem. 256: 11923-31.

Berg, D.T., Calnek, D.S., et Grinnell, B.W. 1995. The human apolipoprotein E gene is negatively regulated in human liver HepG2 cells by the transcription factor BEF-1. J. Biol. Chem. 270: 15447-50.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., et Hannon, G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409: 363-6.

Bierman, E.L., Stein, O., et Stein, Y. 1974. Lipoprotein uptake and metabolism by rat aortic smooth muscle cells in tissue culture. Circ. Res. 35: 136-50.

Bilheimer, D.W., Watanabe, Y., et Kita, T. 1982. Impaired receptor-mediated catabolism of low density lipoprotein in the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 3305-9.

Brewer, H.B., Fairwell, T., LaRue, A., Ronan, R., Houser, A., et Bronzert, T.J., 1978. The amino acid sequence of human apoA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 623-30.

Brewer, H.B.Jr., Santamarina-Fojo, S., et Hoeg, J.M. 1991. The molecular biology of the human plasma apolipoproteins, lipoprotein receptors, and lipoprotein lipase. In G. Steiner & E. Shafrir (Eds.), Primary Hyperlipoproteinemias (pp.43-74). Toronto, Ontario: McGraw-Hill Inc.

Brissette, L., Roach, P.D., et Noel, S.P. 1986. The effects of liposome-reconstituted apolipoproteins on the binding of rat intermediate density lipoproteins to rat liver membranes. J. Biol. Chem. 261: 11631-8.

Brown, M.S., Dana, S.E., et Goldstein, J.L. 1974. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. J. Biol. Chem. 249: 789-96.

Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1974. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. J. Biol. Chem. 249: 7306-14.

Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1983. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. J. Clin. Invest. 72: 743-7.

Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232: 34-47.

Brown, M.S., Herz, J., et Goldstein, J.L. 1997. LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. Nature 388: 629-30.

Brown, M.S., Kovanen, P.T., et Goldstein, J.L. 1979. Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. Recent Prog. Horm. Res. 35: 215-57.

Brown, W.V., et Baginsky, M.L. 1972. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 375-82.

Brundert, M., Heeren, J., Greten, H., et Rinninger, F. 2003. Hepatic lipase mediates an increase in selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters by cells in culture independent from SR-BI. J. Lipid Res. 44: 1020-32.

Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112: 195-203.

Calvo, D., et Vega, M.A. 1993. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. J. Biol. Chem. 268: 18929-35.

Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M.A., et Vega, M.A. 1997. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17: 2341-9.

Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M.A., et Vega, M.A. 1998. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. J. Lipid Res. 39: 777-88.

Cao, G., Garcia, C.K., Wyne, K.L., Schultz, R.A., Parker, K.L., et Hobbs, H.H. 1997. Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. J. Biol. Chem. 272: 33068-76.

Castellini, L.W., et Lusis, A.J. 2001. ApoA-II versus ApoA-I: two for one is not always a good deal. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21: 1870-2.

Charpentier, D., Tremblay, C., Rassart, E., Rhainds, D., Auger, A., Milne, R.W., et Brissette, L. 2000. Low- and high-density lipoprotein metabolism in HepG2 cells expressing various levels of apolipoprotein E. Biochemistry 39: 16084-91.

Chen, C.H., et Albers, J.J. 1985. Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by apolipoproteins E-2, E-3 and A-IV isolated from human plasma. Biochim. Biophys. Acta 836: 279-85.

Chen, S.H., Yang, C.Y., Chen, P.F., Setzer, D., Tanimura, M., Li, W.H., Gotto, A.M. Jr., et Chan, L. 1986. The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. J. Biol. Chem. 261: 12918-21.

Cheung, P., Kao, F.T., Law, M.L., Jones, C., Puck, T.T., et Chan, L. 1984. Localisation of the structural gene for human apolipoprotein A-I on the long arm of human chromosome 11. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 508-11.

Chiu, D.S., Oram, J.F., LeBoeuf, R.C., Alpers, C.E., et O'Brien, K.D. 1997. High-density lipoprotein-binding protein (HBP)/vigilin is expressed in human atherosclerotic lesions and colocalizes with apolipoprotein E. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17: 2350-8.

Cladaras, C., Hadzopoulou-Cladaras, M., Nolte, R.T., Atkinson, D., et Zannis, V.I. 1986. The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. EMBO J. 5: 3495-507.

Clavey, V., Lestavel-Delattre, S., Copin, C., Bard, J.M., et Fruchard, J.C.1995. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15: 963-71.

Clifton-Bligh, P. Nestel, P.J., et Whyte, H.M. 1972. Tangier disease. Report of a case and studies of lipid metabolism. N. Engl. J. Med. 286: 567-71.

Cohen, L.H., et Griffioen, M. 1988. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA contents in human hepatoma cell line Hep G2 by distinct classes of mevalonate-derived metabolites. Biochem. J. 255: 61-7.

Cohn, J.S., Tremblay, M., Amiot, M., Bouthillier, D., Roy, M., Genest, J. Jr., et Davignon J. 1996. Plasma concentration of apolipoprotein E in intermediate-sized remnant-like lipoproteins in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16: 149-59.

Connelly, M.A., Kellner-Weibel, G., Rothblat, G.H., et Williams, D.L. 2003. SR-BI-directed HDL-cholesteryl ester hydrolysis. J. Lipid Res. 44: 331-41.

Connelly, M.A., Klein, S.M., Azhar, S., Abumrad, N.A., et Williams, D.L. 1999. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. J. Biol. Chem. 274: 41-7.

Curry, M.D., McConathy, W.J., Fesmire, J.D., et Alaupovic, P. 1981. Quantitative determination of apolipoproteins C-I and C-II in human plasma by separate electroimmunoassays. Clin. Chem. 27: 543-8.

Daniel, T.O., Schneider, W.J., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1983. Visualization of lipoprotein receptors by ligand blotting. J. Biol. Chem. 258: 4606-11.

Das, H.K., McPherson, J., Bruns, G.A., Karathanasis, S.K., et Breslow, J.L. 1985. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. J. Biol. Chem. 260: 6240-7.

Davison PJ, Norton P, Wallis SC, Gill L, Cook M., Williamson R, et Humphries SR. 1986. There are two gene sequences for human apolipoprotein C1 (APO C1) on chromosome 19, one of which is 4 kb from the gene for apoE. Biochem. Biophys. Res. Commun. 136: 876–84.

Dietschy, J.M., Turley, S.D., et Spady, D.K. 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. J. Lipid Res. 34: 1637-59.

Eisenberg, S. 1984. High density lipoprotein metabolism. J. Lipid Res. 25: 1017-58.

Eisenberg, S., Patsch, J.R., Sparrow, J.T., Gotto, A.M., et Olivecrona, T. 1979. Very low density lipoprotein. Removal of apolipoproteins C-II and C-III during lipolysis in vitro. J. Biol. Chem. 254: 12603-8.

Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., et Protter, A.A. 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. J. Biol. Chem. 268: 11811-6.

Esser, V., Limbird, L.E., Brown, M.S., Goldstein, J.L., et Russell, D.W. 1988. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. J. Biol. Chem. 263: 13282-90.

Fang, D.Z., et Liu, B.W. 2000. Apolipoprotein C-III can specifically bind to hepatic plasma membranes. Mol. Cell Biochem. 207: 57-64.

Fidge, A.H. 1999. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. J. Lipid Res. 40: 187-201.

Fidge, N.H., Nestel, P.J, Ishikawa, T., Reardon, M., et Billington, T. 1980. Turnover of apolipoproteins A-I and A-II of high density lipoprotein and the relationship to other lipoproteins in normal and hyperlipidemic individuals. Metabolism 29: 643-53.

Fielding, C.J., Shore, V.G., et Fielding, P.E. 1972. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 1493-8.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., et Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391: 806-11.

Galeano, N.F., Al-Haideri, M., Keyserman, F., Rumsey, S.C., et Deckelbaum, R.J. 1998. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity. J. Lipid Res. 39: 1263-73.

Glomset, J.A. 1968. The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. J. Lipid Res. 9: 155-67.

Glomset, J.A., Janssen, E.T., Kennedy, R., et Dobbins, J. 1966. Role of plasma lecithin: cholesterol acyltransferase in metabolism of high density lipoproteins. J. Lipid Res. 31: 7639-48.

Goldstein, J.L., Anderson, R.W.G., et Brown, M.S. 1979. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. Nature 279: 679-85.

Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W., et Schneider, W.J. 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. Annu. Rev. Cell Biol. 1:1-39.

Goldstein, J.L., Dana, S.E., et Brown, M.S. 1974. Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 4288-92.

Goldstein, J.L., et Brown. M.S. 1973. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 2804-8.

Gotto, A.M. Jr., Pownall, H.J., et Havel, R.J. 1986. Introduction to the plasma lipoproteins. Methods Enzymol. 128: 3-41.

Graf, G.A., Roswell, K.L., et Smart, E.J. 2001. 17beta-Estradiol promotes the up-regulation of SR-BII in HepG2 cells and in rat livers. J. Lipid Res. 42: 1444-9.

Graham, D.L., et Oram, J.F. 1987. Identification and characterization of a high density lipoprotein-binding protein in cell membranes by ligand blotting. J. Biol. Chem. 262: 7439-42.

Green, P.H., Glickman, R.M., Riley, J.W., et Quinet, E. 1980. Human apolipoprotein A-IV. Intestinal origin and distribution in plasma. J. Clin. Invest. 65: 911-9.

Greenwalt, D.E., Lipsky, R.H., Ockenhouse, C.F., Ikeda, H., Tandon, N.N., et Jamieson, G.A. 1992. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. Blood 80: 1105-15.

Gu, X., Lawrence, R., et Krieger, M. 2000. Dissociation of the high density lipoprotein and low density lipoprotein binding activities of murine scavenger receptor class B type I (mSR-BI) using retrovirus library-based activity dissection. J. Biol. Chem. 275: 9120-30.

Gu, X., Trigatti, B., Xu, S., Acton, S., Babitt, J., et Krieger, M. 1998. The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. J. Biol. Chem. 273: 26338-48.

Hamilton, R.L. 1972. Synthesis and secretion of plasma lipoproteins. Adv. Exp. Med. Biol. 26: 7-24.

Hammad, S.M., Stefansson, S., Twal, W.O., Drake, C.J., Fleming, P., Remaley, A., Brewer, H.B. Jr., et Argraves, W.S. 1999. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 10158-63.

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., et Hannon, G.J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature 404: 293-6.

Harmon, C.M., et Abumrad, N.A. 1993. Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. J. Membr. Biol. 133: 43-9.

Hatch, F.T., et Lees, R.S. 1968. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. Adv. Lipid Res.6: 1-68.

Havekes, L., van Hinsbergh, V., Kempen, H.J., et Emeis, J. 1983. The metabolism in vitro of human low-density lipoprotein by the human hepatoma cell line Hep G2. Biochem. J. 214: 951-8.

Havel, R. J., Fielding, C. J., Olivecrona, T., Shore, V. G., Fielding, P. E et Egelrud, T. 1973. Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoprotein lipase from different sources. Biochemistry 12: 1828–33.

Havel, R.J., et Hamilton, R.L. 1988. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. Hepatology 8: 1689-704.

Havel, R.J., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1980. Lipoproteins and lipid transport. In Metabolic Control and Disease, 8th edition. Bondy, P.K., et Rosenberg, L.E., editors. Saunders, W.B., Philadelphia, PA. 393-494.

Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., et Stanley, K.K. 1988. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. EMBO J. 7: 4119-27.

Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., et Stanley, K.K. 1988. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. EMBO J. 7: 4119-27.

Herz, J., Kowal, R.C., Ho, Y.K., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1990. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytosis of monoclonal antibodies in cultured cells and rabbit liver. J. Biol. Chem. 265: 21355-62.

Huard, K., Bourgeois, P., Rhainds, D., Falstrault, L., Cohn, J.S., et Brissette, L. 2005. Apolipoproteins C-II and C-III inhibit selective uptake of low- and high-density lipoprotein cholesteryl esters in HepG2 cells. Intern. J. Biochem. Cell Biol. 37: 1308-18.

Hubacek, J.A., Pitha, J., Adamkova, V., Skodova, Z., Lanska, V., et R, Poledne. 2003. Apolipoprotein E and apolipoprotein CI polymorphisms in the Czech population: almost complete linkage disequilibrium of the less frequent alleles of both polymorphisms. Physiol. Res. 52: 195–200.

Izem, L., Rassart, E., Kamate, L., Falstrault, L., Rhainds, D., et Brissette, L. 1998. Effect of reduced low-density lipoprotein receptor level on HepG2 cell cholesterol metabolism. Biochem. J. 329: 81-9.

Jahn, C.E., Osborne, J.C. Jr., Schaefer, E.J., et Brewer, H.B. Jr. 1983. Activation of the enzymatic activity of hepatic lipase by apolipoprotein A-II. Characterization of a major component of high density lipoprotein as the activating plasma component in vitro. Eur. J. Biochem. 131: 25-29.

Javitt, N.B. 1990. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. FASEB J. 4: 161-8.

Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M.L., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Swaney, J.B., et Tall, A.R. 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. J. Biol. Chem. 272: 20982-5.

Ji, Z.S., Fazio, S., Lee, Y.L., et Mahley, R.W. 1994. Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. J. Biol. Chem. 269: 2764-72.

Johnson, M.S., Svensson, P.A., Helou, K., Billig, H., Levan, G., Carlsson, L.M., et Carlsson, B. 1998. Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a high density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence. Endocrinology 139: 72-80.

Jong, M.C., Dahlmans, V.E.H., van Gorp, P.J.J., Breuer, M.L., Mol, M.J.T.M., van der Zee, A., Frants, R.R., Hofker, M.H., et Havekes, L.M. 1996a. Both lipolysis and hepatic uptake of VLDL are impaired in transgenic mice coexpressing human apolipoprotein E*3Leiden and human apolipoprotein C1. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16: 934–40.

Jong, M.C., Dahlmans, V.E.H., van Gorp, P.J.J., Willems van Dijk, K., Breuer, M.L., Hofker, M.H., et Havekes, L.M. 1996b. In the absence of the low density lipoprotein receptor, human apolipoprotein C1 overexpression in transgenic mice inhibits the hepatic uptake of very low density lipoproteins via a receptor-associated protein-sensitive pathway. J. Clin. Invest. 98: 2259–67.

Jong, M.C., van Ree, J.H., Dahlmans, V.E.H., Frants, R.R., Hofker, M.H., et Havekes, L.M. 1997. Reduced very-low-density lipoprotein fractional catabolic rate in apolipoprotein C1-deficient mice. Biochem. J. 321: 445–50.

Kambouris, A.M., Roach, P.D., Calvert, G.D., et Nestel, P.J. 1990. Retroendocytosis of high density lipoproteins by the human hepatoma cell line, HepG2. Arteriosclerosis 10: 582-90.

Kane, J.P. 1983. Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. Annu. Rev. Physiol. 45: 637-50.

Karathanasis, S.K. 1985. Apolipoprotein multigene family : tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII, and AIV genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 6374-8.

Kinnumen, P.K. Jr. et Ehnholm, C. 1976. Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. FEBS Lett. 65: 354-7.

Knott, T.J., Robertson, M.E., Priestly, L.M., Wallis, S., et Scott, J. 1984. Characterization of mRNAs encoding the precursor for human apolipoprotein CI. Nucleic Acids Res. 12: 3909–15.

Kowal, R.C., Herz, J., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1990. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. J. Biol. Chem. 265: 10771-9.

Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., et Freeman, M.W. 2002. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. J. Biol. Chem. 277: 49982-8.

Kurata, H., Matsumoto, A., Fujiwara, K., Kondo, K., Koga, T., Fujioka, T., Tsujita, H., Itakura, H., et Fidge, N. 1998. Effect of simvastatin on the expression of HB2 (HDL binding protein) in rabbit. Proceedings of the XIII International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism. 26.

Kushwaha, R. S., Hasan, S. Q., McGill Jr, H. C., Getz, G. S., Dunham, R. G. et Kanda, P. 1993. Characterization of cholesteryl ester transfer protein inhibitor from plasma of baboon (Papio sp.). J. Lipid Res. 34: 1285–97.

Lackner, K.J., Law, S.W., Brewer, H.B.Jr., Sakaguchi, A.Y., et Naylor, S.L. 1984. The human apolipoprotein A-II gene is located on chromosome 1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 877-83.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-5.

Lagrost, L., Dengremont, C., Athias, A., de Geitere, C., Fruchart, J.C., Lallemant, C., Gambert, P., et Castro, G. 1995. Modulation of cholesterol efflux from Fu5AH hepatoma cells by the apolipoprotein content of high density lipoprotein particles. Particles containing various proportions of apolipoprotein A-I and A-II. J. Biol. Chem. 270: 13004-9.

Lagrost, L., Gambert, P., Dangremont, V., Athias, A., et Lallemant, C. 1990. Role of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in the HDL conversion process as evidenced by using anti-CETP monoclonal antibodies. J. Lipid Res. 31: 1569-75.

Landschulz, K.T., Pathak, R.K., Rigotti, A., Krieger, M., et Hobbs, H.H. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. J. Clin. Invest. 98: 984-95.

Langer, T., Strober, W., et Levy, R.I. 1972. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. J. Clin. Invest. 51: 1528-36.

LaRosa, J.C., Levy, R.I., Herbert, P., Lux, S.E., et Fredrickson, D.S. 1970. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 57-62.

Lauer, S., Walker, D., Elshourbagy, N.A., Reardon, C.A., Levy-Wilson, B., et Taylor, J.M. 1988. Two copies of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. J. Biol. Chem. 263: 7277–86.

Lawn, R.M., Wade, D.P., Garvin, M.R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J.G., Seilhamer, J.J., Vaughan, A.M., et Oram, J.F. 1999. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. J. Clin. Invest. 104: 25-31.

Leblond, L., et Marcel, Y.L. 1991. The amphipathic alpha-helical repeats of apolipoprotein A-I are responsible for binding of high density lipoproteins to HepG2 cells. J. Biol. Chem. 266: 6058-67.

Li, W-H., Tanimura, M., Luo, C-C., Datta, S., et Chan, L. 1988. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. J. Lipid Res. 29: 245–71.

Li, X., Peegel, H., et Menon, K.M. 2001. Regulation of high density lipoprotein receptor messenger ribonucleic acid expression and cholesterol transport in theca-interstitial cells by insulin and human chorionic gonadotropin. Endocrinology 142: 174-81.

Liao, W., et Ning, G. 2006. Knockdown of apolipoprotein B, an atherogenic apolipoprotein, in HepG2 cells by lentivirus-mediated siRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 344: 478-83.

Lilly-Stauderman, M., Brown, T.L., Balasubramaniam, A., et Harmony, J.A. 1993. Heparin releases newly synthesized cell surface-associated apolipoprotein E from HepG2 cells. J. Lipid Res. 34: 190-200.

Linton, M.F., Gish, R., Hubl, S.T., Butler, E., Esquivel, C., Boyles, W.I., Wardell, M.R., et Young, S.G. 1991. Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. J. Clin. Invest. 88: 270-81.

Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., et Hannon, G.J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science 305: 1409-10.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., et Randall, R J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-75.

Lux, S.E., John, K.M., Ronan, R., et Brewer, H.B.Jr. 1972. Isolation and caracterization of the tryptic and cyanogen bromide peptides of apoLp-Gln-II (apoA-II), a plasma high density apolipoprotein. J. Biol. Chem. 247: 7519-27.

Maeno, Y., Fujioka, H., Hollingdale, M.R., Ockenhouse, C.F., Nakazawa, S., et Aikawa, M. 1994. Ultrastructural localization of CD36 in human hepatic sinusoidal lining cells, hepatocytes, human hepatoma (HepG2-A16) cells, and C32 amelanotic melanoma cells. Exp. Parasitol. 79: 383-90.

Maeno, Y., Fujioka, H., Hollingdale, M.R., Ockenhouse, C.F., Nakazawa, S., et Aikawa, M. 1994. Ultrastructural localization of CD36 in human hepatic sinusoidal lining cells, hepatocytes, human hepatoma (HepG2-A16) cells, and C32 amelanotic melanoma cells. Exp. Parasitol. 79: 383-90.

Mahley, R.W., Bersot, T.P., LeQuire, V.S., Levy, R.I., Windmueller, H.G., et Brown, W.V. 1970. Identity of very low density lipoprotein apolipoprotein of plasma and liver Golgi apparatus. Science 168: 380-2.

Mahley, R.W., et Innerarity, T.L. 1983. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. Biochim. Biophys. Acta 737: 197-222.

Mahley, R.W., et Innerarity, T.L. 1997. Interaction of canine and swine lipoproteins with the low density lipoprotein receptor of fibroblasts as correlated with heparin/manganese precipitability. J. Biol. Chem. 252: 3980-6.

Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C. et Weisgraber, K.H. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. J. Lipid Res. 25: 1277-94.

Malmendier, C.L., Lontie, J.F., Grutman, G.A., et Delcroix, C. 1986. Metabolism of apolipoprotein C-I in normolipoproteinemic human subjects. Atherosclerosis 62: 167-72.

Martinez, J., et Tuschl, T. 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. Genes Dev. 18: 975-80.

Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., et Tuschl, T. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. Cell 110: 563-74.

Matsumoto, A., Mitchell, A., Kurata, H., Pyle, L., Kondo, K., Itakura, H., et Fidge, N. 1997. Cloning and characterization of HB2, a candidate high density lipoprotein receptor. Sequence homology with members of the immunoglobulin superfamily of membrane proteins. J. Biol. Chem. 272: 16778-82.

McFarlane, AS. 1958. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. Nature 182: 53.

McKeone, B.J., Massey, J.B., Knapp, R.D., et Pownall, H.J. 1988. Apolipoproteins C-I, C-II, and C-III: kinetics of association with model membranes and intermembrane transfer. Biochemistry 27: 4500-5.

Moestrup, S.K., Kozyraki, R., Kristiansen, M., Kaysen, J.H., Rasmussen, H.H., Brault, D., Pontillon, F., Goda, F.O., Christensen, E.I., Hammond, T.G., et Verroust, P.J. 1998. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. J. Biol. Chem. 273: 5235-42.

Montgomery, M.K., Xu, S., et Fire, A. 1998. RNA as a target .of double-stranded RNA-mediated genetic interference in Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 15502-7.

Mowri, H.O., Patsch, J.R., Gotto, A.M. Jr., et Patsch, W. 1996. Apolipoprotein A-II influences the substrate properties of human HDL2 and HDL3 for hepatic lipase. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16: 755-62.

Murao, K., Terpstra, V., Green, S.R., Kondratenko, N., Steinberg, D., et Quehenberger, O. 1997. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. J. Biol. Chem. 272:1 7551-7.

Nestel, P.J., et Fidge, N.H. 1982. Apoprotein C metabolism in men. Adv. Lipid Res. 19: 55-83.

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

Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B., Tomiyama, Y., Nakata, A., Ishigami, M., Miyagawa, J., Kameda-Takemura, K., et al. 1995 .Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. J. Clin. Invest. 96: 1859-65.

Nykanen, A., Haley, B., et Zamore, P.D. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107: 309-21.

Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., et Seed, B. 1989. CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. Cell 58: 95-101.

Oram, J.F., et Vaughan, A.M. 2000. ABCA-I mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL-apolipoproteins. Curr. Opin. Lipidol. 11: 253-60.

Pearse, B.M. 1976. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 1255-9.

Pittman, R.C., et Steinberg, D. 1984. Sites and mechanisms of uptake and degradation of high density and low density lipoproteins. J. Lipid Res. 25: 1577-85. Review.

Poensgen, J. 1990. Apolipoprotein C-I inhibits the hydrolysis by phospholipase A2 of phospholipids in liposomes and cells membranes. Biochim. Biophys. Acta 1042: 188-92.

Pontius, B.W., et Berg, P. 1990. Renaturation of complementary DNA strands mediated by purified mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein: implications for a mechanism for rapid molecular assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 8403-7.

Powell, L.M., Wallis, S.C., Pease, R.J., Edwards, Y.H., Knott, T.J., et Scott, J. 1987. A novel form of tissue specific RNA processing produced apo B-48 in intestine. Cell 50: 831-40.

Rall, S.C. Jr., Weisgraber, K.H., et Mahley, R.W. 1982. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. J. Biol. Chem. 257: 4171-8.

Rash, J.M., Rothblat, G.H., et Sparks, C.E. 1981. Lipoprotein apolipoprotein synthesis by human hepatoma cells in culture. Biochim. Biophys. Acta 666: 294-8.

Raynolds, A., Leake, D., Scaringe, S., Marshall, W.S., Boese, Q., et Khvorova, A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. Nat. Biotechnol. 22: 326-30.

Rhainds, D. et Brissette, L. 2004. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. Defining the rules for lipid traders. Review. Intern. J. Biochem. Cell Biol. 36: 39-77.

Rhainds, D., Bourgeois, P., Bourret, G., Huard, K., Falstrault, L., et Brissette, L. 2004. Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. J. Cell Sci. 117: 3095-105.

Rhainds, D., Brodeur, M., Lapointe, J., Charpentier, D., Falstrault, L., et Brissette, L. 2003. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. Biochemistry 42: 7527-38.

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

Rozek, A., Buchko, G.W., Cushley, R.J. 1995. Conformation of two peptides corresponding to human apolipoprotein C-I residues 7-24 and 35-53 in the presence of sodium dodecyl sulfate by CD and NMR spectroscopy. Biochemistry 34: 7401–8.

Rubin, E.M., Krauss, R.M., Spangler, E.A., Verstuyft, J.G., et Clift, S.M. 1991. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein A-I. Nature 353: 265-7.

Russell, D.W., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1989. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. J. Biol. Chem. 264: 21682-8.

Sahali, D., Mulliez, N., Chatelet, F., Laurent Winter, C., Citadelle, D., Roux, C., Ronco, P., et Verroust, P. 1992. Coexpression in humans by kidney and fetal envelopes of a 280 kDa-

coated pit-restricted protein. Similarity with the murine target of teratogenic antibodies. Am. J. Pathol. 140: 33-44.

Sato, K., Takahashi, Y., Takahashi, T., Katoh, N., et Akiba, Y. 2002. Identification of factors regulating lipoprotein lipase catalysed hydrolysis in rats with the aid of monoacid-rich lipoprotein preparations (1). J. Nutr. Biochem. 13: 528-38.

Saucier, S.E., Kandutsch, A.A., Gayen, A.K., Swahn, D.K., et Spencer, T.A. 1989. Oxysterol regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in liver. Effect of dietary cholesterol. J. Biol. Chem. 264: 6863-9.

Savill, J., Hogg. N., Ren, Y., et Haslett, C. 1992. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. J. Clin. Invest. 90: 1513-22.

Scanu, A.M., et Landsberger, F.R. 1980. Lipoprotein structure. Ann. N.Y. Acad. Sci. 348: 1-436.

Scatchard, G. 1949. The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660-7.

Schaefer, E.J., Ordovas, J.M., Law, S.W., Ghiselli, G., Kashyap, M.L., Srivastava, L.S., Heaton, W.H., Alberts, J.J., Connor, W.E., Lindgren, F.T., et al. 1985. Familial apolipoprotein A-I and C-III deficiency, variant II. J. Lipid Res. 26: 1089-101.

Schagger, H., et von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-79.

Schonfeld, G., George, P.K., Miller, J., Reilly, P., et Witztum, J. 1979. Apolipoprotein C-II and C-III levels in hyperlipoproteinemia. Metabolism 28: 1001-10.

Seetharam, B., Christensen, E.I., Moestrup, S.K., Hammond, T.G., et Verroust, P.J. 1997. Identification of rat yolk sac target protein of teratogenic antibodies, gp280, as intrinsic factor-cobalamin receptor. J. Clin. Invest. 99: 2317-22.

Segrest, J.P., Jackson, R.L., Morrisett, J.D., et Gotto, A.M. Jr. 1974. A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. FEBS Lett. 38: 247-58.

Sehayek, E., et Eisenberg, S. 1991. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. J. Biol. Chem. 266: 18259-67.

Shachter, N.S., Ebara, T., Ramakrishnan, R., Steiner, G., Breslow, J.L., Ginsberg, H.N., et Smit, J.D. 1996. Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. J. Clin. Invest. 98: 846–55.

Shachter, N.S., Zhu, Y., Walsh, A., Breslow, J.L., et Smith, J.D. 1993. Localization of a liver-specific enhancer in the apolipoprotein E/C-I/C-II gene locus. J. Lipid Res. 34: 1699–707.

Shinomiya, M., Sasaki, N., Barnhart, R.L., Shirai, K., et Jackson, RL. 1982. Effect of apolipoproteins on the hepatic lipase-catalyzed hydrolysis of human plasma high density lipoprotein2-triacylglycerols. Biochim. Biophys. Acta 713: 292-9.

Sigurdsson, G., Nicoll, A., et Lewis, B. 1975. Conversion of very low density lipoprotein to low density lipoprotein. J. Clin. Invest. 56: 1481-90.

Silver, D.L., Wang, N., Xiao, X., et Tall, A.R. 2001. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. J. Biol. Chem. 276: 25287-93.

Silver, D.L., Wang, N., Xiao, X., et Tall, A.R. 2001. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. J. Biol. Chem. 276: 25287-93.

Simonet, W.S., Bucay, N., Lauer, S.J., et Taylor, J.M. 1993. A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice. J. Biol. Chem. 268: 8221–29.

Simonet, W.S., Bucay, N., Pitas. R.E., Lauer, S.J., et Taylor, J.M. 1991. Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. J. Biol. Chem. 266: 8651–4.

Small, D.M. 1992. Structure and metabolism of the plasma lipoproteins. In Current Issues in Endocrinology and Metabolism: Plasma lipoproteins and coronary artery diseases, ed. Kreisberg, R.A., Segrest, J.P., pp. 57-91. Boston: Blackwell Scientific Publications.

Smit, M., van der Kooij-Meijs, E., Frants, R.R., Havekes, L.M., et Klasen, E.C. 1988. Apolipoprotein gene cluster on chromosome 19: definite localization of the APOC2 gene and the polymorphic HpaI site associated with type III hyperlipoproteinemia. Hum. Genet. 78: 90–3.

Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., et Joshua-Tor, L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science 305: 1434-7.

Soutar, A.K., Garner, C.W., Baker, H.N., Sparrow, J.T., Jackson, R.L., Gotto, A.M. et Smith, L.C. 1975. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl dinor on the activity of lecithin:cholesterol acyltransferase. Biochemistry 14: 3057-64.

Sparks, C.E., et Marsh, J.B. 1981. The metabolic heterogeneity of apolipoprotein B in the rat. J. Lipid Res. 22: 519-27.

Stein, O., Stein, Y., Lefevre, M., et Roheim, P.S. 1986. The role of apolipoprotein A-IV in reverse cholesterol transport studied with cultured cells and liposomes derived from an ether analog of phosphatidylcholine. Biochim. Biophys. Acta 878: 7-13.

Steinmetz, A., et Utermann, G. 1985. Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein A-IV. J. Biol. Chem. 260: 2258-64.

Südhof, T.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., et Russell, D.W. 1985. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. Science 228: 815-22.

Swaney, J.B., et Weisgraber, K.H. 1994. Effect of apolipoprotein C-I peptides on the apolipoprotein E content and receptor-binding properties of ß-migrating very low density lipoproteins. J. Lipid Res. 35: 134–42.

Swarnakar, S., Beers, J., Strickland, D.K., Azhar, S., et Williams, D.L. 2001. The apolipoprotein E-dependent low density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake pathway in murine adrenocortical cells involves chondroitin sulfate proteoglycans and an alpha 2-macroglobulin receptor. J. Biol. Chem. 276: 21121-8.

Thuahnai, S.T., Lund-Katz, S., Anantharamaiah, G.M., Williams, D.L., et Phillips, M,C. 2003. A quantitative analysis of apolipoprotein binding to SR-BI: multiple binding sites for lipid-free and lipid-associated apolipoproteins. J. Lipid Res. 44: 1132-42.

Thuahnai, S.T., Lund-Katz, S., Williams, D.L., et Phillips, M.C. 2001. Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. J. Biol. Chem. 276: 43801-8.

Thuren, T. 2000. Hepatic lipase and HDL metabolism. Curr. Opin. Lipidol. 11: 277-83. Review.

Tozuka, M., et Fidge, N. 1989. Purification and characterization of two high-density-lipoprotein-binding proteins from rat and human liver. Biochem. J. 261: 239-44.

van Ree, J.H., Hofker, M.H., van den Broek, W.J.A.A., van Deursen, J.M.A., van der Boom, H., Frants, R.R., Wieringa, B., et Havekes, L.M. 1995. Increased response to cholesterol feeding in apolipoprotein C1-deficient mice. Biochem. J. 305: 905–11.

Vance, D.E., et Vance, J.E. 1993. Biochemistry of lipids and membranes. Don Mills, Ontario: The Benjamin Cummings Publishing Co.

Vassiliou, G., Benoist, F., Lau, P., Kavaslar, G.N., et McPherson, R. 2001. The low density lipoprotein receptor-related protein contributes to selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by SW872 liposarcoma cells and primary human adipocytes. J. Biol. Chem. 276: 48823-30.

Watkins, P.A., Ferrell, E.V. Jr., Pedersen, J.I., et Hoefler, G. 1991. Peroxisomal fatty acid beta-oxidation in HepG2 cells. Arch. Biochem. Biophys. 289: 329-36.

Webb, N.R., Connell, P.M., Graf, G.A., Smart, E.J., de Villiers, W.J., de Beer, F.C., et van der Westhuyzen, D.R. 1998. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. J. Biol. Chem. 273: 15241-8.

Webb, N.R., de Villiers, W.J., Connell, P.M., de Beer, F.C., et van der Westhuyzen, D.R. 1997. Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). J. Lipid Res. 38: 1490-5.

Weisgraber, K.H., Bersot, T.P., et Mahley, R.W. 1978. Isolation and characterization of an apoprotein from the d<1.006 lipoproteins of human and canine lymph homologous with the rat A-IV apoprotein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85: 287-92.

Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Kowall, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1990. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with ß-migrating very low

density lipoproteins (ß-VLDL) and inhibits binding of ß-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. J. Biol. Chem. 265: 22453–9.

Williams, D.L., Connelly, M.A., Temel, R.E., Swarnakar, S., Phillips, M.C., de la Llera-Moya, M., et Rothblat, G.H. 1999. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. Curr. Opin. Lipidol. 10: 329-39.

Windmueller, H.G., Herbert, P.N., et Levy, R.I. 1973. Biosynthesis of lymph and plasma lipoprotein apolipoproteins by isolated perfused rat liver and intestine. J. Lipid Res. 14: 215-23.

Wu, A.L., et Windmueller, H.G. 1979. Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. J. Biol. Chem. 254: 7316-22.

Xu, S., Laccotripe, M., Huang, X., Rigotti, A., Zannis, V.I., et Krieger, M. 1997. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. J. Lipid Res. 38: 1289-98.

Xu, Y., L. Berglund, R. Ramakrishnan, R. Mayeux, C. Ngai, S. Holleran, B. Tycko, T. Leff, et N. S. Shachter. 1999. A common Hpa I RFLP of apolipoprotein C-I increases gene transcription and exhibits an ethnically distinct pattern of linkage disequilibrium with the alleles of apolipoprotein E. J. Lipid Res. 40: 50–8.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., et Bartel, D.P. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101: 25-33.

Zannis, V.I., Breslow, J.L., SanGiacomo, T.R., Aden, D.P., et Knowles, B.B. 1981. Characterization of the major apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines. Biochemistry 20: 7089-96.