

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CONTRIBUTION DE LA L-FABP  
A LA CAPTATION SÉLECTIVE DES  
ESTERS DE CHOLESTÉROL DES LDL ET HDL

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

LÉO OCTAVIUS

JANVIER 2009

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

Je tiens tout d'abord à rendre hommage à toutes les forces, quelles qu'elles soient, ayant contribué de près ou de loin à mon cheminement jusqu'au jour d'aujourd'hui. Je désire ensuite remercier ma directrice de recherche, le Dr Louise Brissette, pour m'avoir donné la chance de faire partie intégrante de son laboratoire et pour m'avoir éveillé à la recherche scientifique.

Je tiens à remercier Louise Falstrault qui m'a fait profiter de son expérience pratique, d'abord en culture cellulaire et aussi pour la plupart des expériences réalisées. Ses conseils m'ont permis de donner une meilleure structure et un meilleur rendement à mon travail quotidien. Il aurait été beaucoup plus difficile de mener à bien ce projet sans la formation qu'elle m'a donnée.

Je ne voudrais surtout pas oublier mes collègues de travail pour tous les moments passés ensemble. De par vos suggestions et questions, vous avez facilité mon apprentissage. En particulier Mathieu, Vilay et Veneta, non seulement pour leur aide, mais, dont l'intérêt pour mon projet et son avancement m'ont particulièrement touché.

Aussi je me dois de remercier Louis-Charles Levros et Sonia Do Carmo, pour m'avoir initié à mes premières manipulations en biotechnologie.

Je tiens particulièrement à remercier Elsa Étilé qui m'a soutenu tout au long de ma maîtrise, épaulé et enduré dans les moments difficiles quand les jours et les heures n'étaient plus importants.

Merci à mes parents et ma famille qui, à par l'aide qu'ils m'ont apporté depuis mon arrivée à l'UQAM, m'ont permis de sortir de mon île, de m'ouvrir l'esprit et d'accéder à une autre source de savoir.

Tout le monde veut vivre au sommet de la montagne mais les joies et l'accomplissement n'arrivent que durant l'ascension.

Non partial, non political

Haïlé I !

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ.....	xi
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1.1 LES LIPIDES.....	1
1.2 LES LIPOPROTÉINES.....	1
1.2.1 Chylomicrons (CM).....	2
1.2.2 Lipoprotéines de très faible densité (VLDL).....	3
1.2.3 Lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL).....	3
1.2.4 Lipoprotéines de faible densité (LDL).....	5
1.2.5 Lipoprotéines de haute densité (HDL).....	5
1.3 LES APOLIPOPROTÉINES (APO) :.....	7
1.4 LE RÉCEPTEUR DE LDL (rLDL).....	10
1.4.1 Structure et fonction.....	10
1.4.2 Synthèse et cycle du rLDL.....	11
1.5 CAPTATION SÉLECTIVE.....	12
1.5.1 Le SR-BI appartient à la famille des récepteurs éboueurs.....	13
1.5.2 Expression tissulaire et cellulaire de SR-BI.....	13
1.5.3 Structure de la protéine.....	14
1.5.4 Rôles de SR-BI dans le métabolisme du cholestérol.....	14
1.5.5 Régulation de l'expression de SR-BI.....	16
1.6 LES TRANSPORTEURS D'ACIDES GRAS.....	17
1.7 L-FABP.....	18
1.7.1 Le gène.....	18
1.7.2 Ligands.....	19
1.7.3 Régulation.....	19
1.7.4 Rôle et implications.....	20
1.8 BUTS ET OBJECTIFS GÉNÉRAUX.....	23

<b>2</b>	<b>MÉTHODOLOGIE</b>	<b>25</b>
2.1	MATÉRIEL .....	25
2.2	ISOLEMENT DES LIPOPROTÉINES. ....	25
2.3	MARQUAGE DES LIPOPROTÉINES. ....	26
2.4	CULTURE CELLULAIRE .....	27
2.5	SÉLECTION DE LIGNÉES CELLULAIRES TRANSFECTÉES DE FAÇON STABLE	27
2.6	ÉVALUATION DES TAUX D'EXPRESSION PROTÉIQUE DES SR-BI, L-FABP, RDL ET B-ACTINE.....	28
2.7	ANALYSE PAR RT-PCR DE L'EXPRESSION DES ARNm DES L-FABP, SR-BI ET GAPDH .....	28
2.8	CAPTATION SÉLECTIVE DES ESTERS DE CHOLESTÉROL DES LDL ET DES HDL.....	29
2.9	HYDROLYSE DES ESTERS DE CHOLESTÉROL.....	30
2.10	INTERFÉRENCE À L'ARN .....	30
2.11	STIMULATION DE L'EXPRESSION DE LA L-FABP PAR DES AGONISTES DES PPARALPHA .....	31
2.12	ANALYSE STATISTIQUE.....	31
2.13	AUTRES MÉTHODES UTILISÉES .....	31
<b>3</b>	<b>RÉSULTATS</b>	<b>32</b>
3.1	IMPACT DES LDL SUR LES PRINCIPAUX ACTEURS DE LA CAPTATION DE LEURS ESTERS DE CHOLESTÉROL .....	32
3.2	SUREXPRESSION DE LA L-FABP DANS DES HÉPATOCARCINOMES HUMAINS HEPG2 .....	35
3.3	IMPACT DE LA L-FABP SUR LA CAPTATION SÉLECTIVE DES ESTERS DE CHOLESTÉROL PROVENANT DES LDL .....	39
3.4	IMPACT DE LA L-FABP SUR LA CAPTATION SÉLECTIVE DES ESTERS DE CHOLESTÉROL PROVENANT DES HDL .....	43

3.5	CONTRIBUTION DE LA L-FABP À L'HYDROLYSE DES ESTERS DE CHOLESTÉROL DES LDL ET HDL.....	47
3.6	AUTRES STRATEGIES ABORDEES.....	51
4	DISCUSSION	<b>55</b>
4.1	IMPACT DES LDL SUR LES PRINCIPAUX ACTEURS DE LA CAPTATION DE LEURS ESTERS DE CHOLESTÉROL. ....	55
4.2	LA SUREXPRESSION DE LA L-FABP DANS DES HÉPATOCARCINOMES HUMAINS HEPG2 N'AFECTE PAS SR-BI.....	56
4.3	IMPACT DE LA L-FABP SUR LA CAPTATION SÉLECTIVE DES ESTERS DE CHOLESTÉROL PROVENANT DES LDL ET HDL .....	57
4.4	CONTRIBUTION DE LA L-FABP À L'HYDROLYSE DES ESTERS DE CHOLESTÉROL DES LDL ET HDL .....	57
4.5	INTERFÉRENCE À L'ARNM DE LA L-FABP .....	59
5	CONCLUSION	<b>60</b>
6	BIBLIOGRAPHIE	<b>62</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> RT-PCR des ARNm de SR-BI et de la L-FABP après une exposition de cellules HepG2 à des LDL.....	33
<b>Figure 2 :</b> Niveaux protéiques des rLDL, SR-BI et L-FABP après une exposition de cellules HepG2 à des LDL.....	34
<b>Figure 3 :</b> Niveaux protéiques de SR-BI et de la L-FABP après transfection de cellules HepG2 avec l'ADNc codant pour la L-FABP.....	36
<b>Figure 4 :</b> Association lipidique des LDL aux cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux.....	40
<b>Figure 5 :</b> Association protéique des LDL aux cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux.....	41
<b>Figure 6 :</b> Association des <sup>3</sup> H-EC provenant des LDL causée par la captation sélective chez des cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux.....	42
<b>Figure 7:</b> Association lipidique des HDL aux cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux.....	44
<b>Figure 8 :</b> Association protéique des HDL aux cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux.....	45
<b>Figure 9 :</b> Association des <sup>3</sup> H-EC provenant des HDL causée par la captation sélective chez des HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux.....	46
<b>Figure 10 :</b> Efficacité d'hydrolyse des esters de cholestérol des LDL par des cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux.....	48
<b>Figure 11 :</b> Efficacité d'hydrolyse des esters de cholestérol des HDL par des cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux.....	50
<b>Figure 12 :</b> Niveaux protéiques de la L-FABP et de la $\beta$ -actine des cellules HepG2 après l'application d'une stratégie d'interférence à l'ARNm codant pour la L-FABP.....	52

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Les différentes classes de lipoprotéines et leur composition en protéines et en lipides.....	4
<b>Tableau II :</b> Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines.....	8
<b>Tableau III :</b> Taux d'expression de la L-FABP et de SR-BI après la transfection de cellules HepG2 avec l'ADNc codant pour la L-FABP..	36
<b>Tableau IV:</b> Taux d'expression de la L-FABP des cellules HepG2 après interférence à l'ARNm codant pour la L-FABP. ....	53

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCA1	« ATP-binding cassette transport protein A1 »
ACAT	Acyl-coenzyme A: cholestérol acyltransférase
ACEH	Cholestéryl ester hydrolase acide lysosomale
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
Apo	Apolipoprotéine
APOBEC-1	« Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1 »
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Albumine de sérum bovin
CD36	« Cluster de différenciation 36 »
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol
CHO	Cellules d'ovaire de hamster chinois
CL	Cholestérol libre
CM	Chylomicrons
CYP27A1	Stérol 27-hydroxylase
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
EC	Ester de cholestérol
EDTA	Éthylène diamine tétracétate

FAT	Translocase des acides gras
FATP	Protéine de transfert des acides gras
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HMG CoA red	Hydroxy-méthyl-glutaryl <i>CoA</i> réductase
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire
KO	« Knock out »
LCAT	Lécithine cholestérol acyl-transférase
LCFA	Acide gras à longue chaîne
LDL	Lipoprotéine de faible densité
L-FABP	« Liver fatty acid binding protein »
LH	Lipase hépatique
LIMP II	Protéine membranaire lysosomale II
LPL	Lipoprotéine lipase
LRP	Protéine apparentée au récepteur de lipoprotéines de faible densité
MCV	Maladie cardiovasculaire
MEM	Milieu essentiel minimum
NCEH	Cholestéryl ester hydrolase neutre extralysosomale

PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PL	Phospholipide
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl-
PMSG	hormone gonadotrope sérique de jument gravide
PPAR	Récepteur au facteur activé de prolifération des peroxyosomes
rLDL	Récepteur de lipoprotéines de faible densité
RXR	Récepteur X rétinol
SCP-2	Protéine transporteuse de stérols-2
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide au sodium dodécyl sulfate
SREBP	Protéine liant l'élément de réponse aux stérols
SR-BI	Récepteur éboueur de type B classe 1
TBS	Tampon Tris salin
TG	Triglycéride
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

## RÉSUMÉ

Les lipoprotéines, complexes composés de protéines et de lipides, sont les principaux constituants permettant de transporter les lipides dans l'organisme et de les délivrer aux cellules. Elles peuvent être classées selon leur densité ou leur composition en apolipoprotéines. Ces dernières sont d'ailleurs les éléments permettant aux lipoprotéines d'être reconnues par la cellule puis d'être exploitées. Essentiellement, deux voies permettent aux lipides de passer de la lipoprotéine à la cellule. À chaque voie correspond des récepteurs particuliers, ainsi, la captation globale des lipoprotéines de faible densité (LDL), réalisée par le biais des récepteurs de LDL (rLDL), se décrit comme l'assimilation et la dégradation de la lipoprotéine dans sa totalité par la voie endosomale/lysosomale. La captation sélective, quant à elle, consiste en un transfert des lipides, en l'occurrence des esters de cholestérol (EC), de la lipoprotéine à la cellule par l'intermédiaire de récepteurs tels que le *récepteur éboueur de classe B type I* (SR-BI). Les produits de dégradation des esters de cholestérol qui sont des acides gras peuvent réguler la transcription de certains gènes du métabolisme des lipides, telle la protéine L-FABP « *liver fatty acid binding protein* » dédiée au transport des acides gras. La capacité, de la L-FABP à lier le cholestérol, a été évoquée, mais demeure encore sujet à controverses. De précédents travaux menés par David Rhainds au sein de notre laboratoire ont révélé une forte augmentation de l'expression de la L-FABP dans des cellules HepG2 surexprimant le SR-BI. Le but de l'étude menée ici était de déterminer si la L-FABP travaille avec le SR-BI pour la captation sélective des esters de cholestérol ou si l'augmentation de la L-FABP remarquée est due aux acides gras produits par cette réaction. Pour cela, des cellules HepG2 ont été incubées avec des LDL afin de vérifier l'effet de la captation sélective sur les récepteurs pouvant être impliqués et sur la L-FABP. Ensuite une transfection stable de cellules HepG2 avec un vecteur contenant l'ADN de la L-FABP a été réalisée dans le but d'observer la contribution de la L-FABP dans différents processus. Ainsi, le niveau des récepteurs impliqués dans la captation sélective des (EC) a été vérifié chez ces clones. Des essais d'association et des mesures de captation sélective ont été effectués. Enfin des essais d'hydrolyse en absence et en présence d'un inhibiteur de l'hydrolyse des EC ont été réalisés pour statuer de l'éventuel impact de la L-FABP, en tant que transporteur de stérols, ou d'acides gras générés par l'hydrolyse d'EC sur les voies d'hydrolyse des EC. Dans cette même optique, une stimulation de la L-FABP avec des agonistes des « Peroxysome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$  » PPAR $\alpha$  a été tentée. Enfin, une interférence à l'ARN de la L-FABP a été effectuée dans le but d'en vérifier l'impact sur le métabolisme des EC des LDL et HDL. Les résultats ne montrent pas de modulation des rLDL, SR-BI et L-FABP par l'entrée d'EC des LDL dans les cellules. Dans les cellules surexprimant la L-FABP, l'expression de SR-BI n'a pas été

affectée. Les surexpressions ont aussi permis de remarquer que la L-FABP n'avait, ni d'effet significatif sur la captation sélective des EC des LDL ou HDL, ni d'impact sur la voie d'hydrolyse empruntée par ces derniers. L'interférence à l'ARN de la L-FABP, réalisée dans le but de voir l'effet d'une absence de cette protéine, fournissant la réponse à cette hypothèse n'a pas été assez efficace et demande encore une optimisation afin d'élucider de façon concluante le rôle de la L-FABP dans le processus de captation sélective des EC des LDL et HDL.

*Mots clés* : LDL, HDL, SR-BI, L-FABP, captation sélective.

# 1 INTRODUCTION

## *1.1 Les Lipides*

Les lipides font partie des macromolécules essentielles à la vie. En effet, en plus de leurs propriétés énergétiques, ils sont les précurseurs des acides biliaires, des hormones stéroïdes et représentent les composés majeurs des membranes cellulaires. Il est possible de retrouver les lipides sous plusieurs formes. Le cholestérol, les acides gras, triglycérides (TG) et les phospholipides (PL) sont celles les plus communément retrouvées.

## *1.2 Les Lipoprotéines*

Les lipoprotéines sont décrites comme des particules globulaires de haut poids moléculaire. Elles présentent une membrane formée d'une monocouche de PL et de cholestérol libre (CL), un centre apolaire composé essentiellement de lipides comme les TG et esters de cholestérol (EC) et sont aussi associées à des protéines appartenant à la grande famille des apoprotéines ou apolipoprotéines (apo). En plus d'avoir un rôle structural contribuant à la cohésion et à la solubilité des lipoprotéines, les apo seraient liées à la reconnaissance cellulaire des lipoprotéines et à la régulation de certaines enzymes.

Les lipides sont surtout transportés par les lipoprotéines d'un tissu à l'autre, ainsi, le transport de molécules hydrophobes (les lipides) en milieu hydrophile (le plasma sanguin) est rendu possible. Les lipides contenus dans les lipoprotéines sont destinés à la production d'énergie, au stockage de composés énergétiques, à la production et au maintien de la membrane cellulaire et à la fabrication de différentes substances

endogènes, telles que les hormones stéroïdiennes et les acides biliaires. La composition, la structure et la fonction des lipoprotéines sont modifiées au cours de leur voyage dans le sang. Un processus de captation permettra aux lipoprotéines de déverser leur contenu dans les cellules.

Il est possible de classer les lipoprotéines selon leurs propriétés physiques (taille et densité) (Krauss *et al.* 1982), mais aussi selon leur composition en lipides et protéines et selon leur fonction (Campos *et al.* 2001). Le tableau I présente les lipoprotéines ordonnées selon leur densité.

Les principales classes de lipoprotéines sont : Les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), les lipoprotéines de faible densité (LDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), et les lipoprotéines de haute densité (HDL) (Mahley *et al.* 1984).

### 1.2.1 Les Chylomicrons (CM)

Les chylomicrons sont responsables du transport des lipides alimentaires des intestins aux tissus en passant par la lymphe. En effet, les TG et le cholestérol provenant de la diète, une fois absorbés, sont conglomérés sous forme de grosses lipoprotéines appelées chylomicrons. Ce nom provient du chyle, lieu où ces particules font l'acquisition des apoC-II et E, qui sont essentielles à leur clairance. Leur diamètre varie entre 800 et 5000 Å, et leur densité est de 0,93 g/ml. Ils sont composés de 86% de TG, 3% d'EC, 2% de CL, 7% de PL et 2% de protéines. Une particule de CM contient normalement de l'apoA-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III et E. L'apoB-48 est cependant nécessaire à l'assemblage originel du CM (Redgrave *et al.* 1999; Pownall *et al.* 1999). Ainsi, par l'action de la « Microsomal Transfer Protein » (MTP), la lipodation de l'apoB-48 peut avoir lieu. Quand les chylomicrons passent

dans la circulation sanguine, la lipoprotéine lipase (LPL) associée aux capillaires sanguins exerce son action sur les triacylglycérols (Redgrave, 2004). Les résidus de chylomicrons résultant de l'activité de la LPL sont ultérieurement pris en charge dans les cellules parenchymateuses du foie par le rLDL (Mahley *et al.* 1989) et la LRP « LDL receptor related protein » grâce à l'apoE (Kowal *et al.* 1989). Le catabolisme se poursuit dans les cellules par une hydrolyse dans les lysosomes après l'endocytose (Havel et Hamilton, 1988). Le CL formé résulte de la scission des EC des résidus de chylomicrons et redevient disponible à tout usage par l'organisme.

#### 1.2.2 Lipoprotéines de très faible densité (VLDL)

Les VLDL sont fabriquées et sécrétées par le foie à partir de lipides endogènes. Elles acheminent ces lipides du foie aux tissus périphériques. Leur diamètre varie entre 300 et 700 Å et leur densité oscille entre 0,95 et 1,010 g/ml, elles sont composées de 55% de TG, 12% d'EC, 7% de CL, 18% de PL et 8% de protéines. Les apoB-100, E, C-I, C-II et C-III composent essentiellement la fraction protéique. L'apoB-100 est essentielle à l'assemblage et au bon fonctionnement de la VLDL. Ainsi, une certaine hétérogénéité de composition a été remarquée au sein d'une même population de VLDL. La composition elle-même varie à partir de la production de la VLDL vers sa conversion en IDL au fur et à mesure que les lipases viennent hydrolyser les TG dont les acides gras seront utilisés par les cellules (Ginsberg *et al.* 1999 ; Pownall *et al.* 1999 ; Berneis *et al.* 2002). Peu de VLDL peuvent être prises en charge par le rLDL ou la LRP (Mahley, 1988). En vaste majorité ces lipoprotéines sont traitées par les lipases comme la LPL ou la lipase hépatique (LH) de façon à générer des IDL et LDL (Mahley *et al.* 1984).

#### 1.2.3 Lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL)

Les IDL résultent de l'hydrolyse des VLDL par les lipases. Les IDL ont une taille et une densité intermédiaire à celles des VLDL et LDL, soit de 272 à 300 Å et de 1,008

à 1,019 g/ml. Elles sont composées de 23% de TG, 29% d'EC, 9% de CL, 19% de PL et 19% de protéines. Les apoC présentes chez les VLDL, HDL et CM perdent leur affinité pour les IDL. Cependant, une molécule d'apoB-100 de même que plusieurs

**Tableau I :** Les différentes classes de lipoprotéines et leur composition en protéines et en lipides (Fielding et Fielding, 1996).

Classes de Lipoprotéines	Densité g/ml	Diamètre (Å)	Lipides (% p/p)				Protéines (% p/p)	Apoprotéines contenues
			TG	EC	CL	PL		
Chylomicrons	0,93	800 à 5000	86	3	2	7	2	apoA-I,-IV apoB-48 apoC-I,-II,-III apoE
VLDL	0,95 à 1,010	300 à 800	55	12	7	18	8	apoB-100 apoC-I,-II,-III apoE
IDL	1,008 à 1,019	250 à 350	23	29	9	19	19	apoB-100 apoC-I,-II,-III apoE
LDL	1,019 à 1,060	220 à 272	6	42	8	22	22	apoB-100
HDL2	1,063 à 1,125	90 à 100	5	17	5	33	40	apoA-I,-II apoC-I,-II,-III apoE
HDL3	1,125 à 1,210	70 à 90	3	13	4	25	55	apoA-I,-II apoC-I,-II,-III

molécules d'apoE sont présentes à la surface de chaque IDL (Pownall *et al.* 1999 ; Berneis *et al.* 2002).

#### 1.2.4 Lipoprotéines de faible densité (LDL)

Les LDL sont issues des IDL et font partie de la dernière classe de lipoprotéines de la cascade des lipoprotéines contenant l'apoB-100. La perte de TG induite par l'action des lipases lors du passage de VLDL en LDL permet un enrichissement en EC. La taille des LDL est de l'ordre de 220 à 272 Å et leur densité varie entre 1,019 et 1,060 g/ml. Elles sont composées d'environ 6% de TG, 42% d'EC, 8% de CL, 22% de PL et 22% de protéines. En terme protéique, elles ne sont composées que d'une seule molécule d'apoB-100. Celle-ci intervient dans le maintien de l'intégrité structurale de la particule. Une hétérogénéité est constatée chez les LDL au niveau de leur densité, leur taille et de quelques autres propriétés (Krauss et Burke, 1982).

#### 1.2.5 Lipoprotéines de haute densité (HDL)

Les particules de HDL en circulation peuvent être divisées en trois catégories selon leur densité : les HDL naissantes, les HDL<sub>2</sub> et les HDL<sub>3</sub>. Les HDL naissantes ont une forme discoïdale stabilisée par les apo. Elles sont sécrétées par le foie et l'intestin et sont dérivées des résidus d'hydrolyse des lipoprotéines riches en TG (CM et VLDL) (Eisenberg, 1984). Les HDL naissantes font acquisition de leurs lipides de différentes façons. Ainsi, le CL peut provenir de résidus de CM ou de VLDL, mais aussi d'autres lipoprotéines. Parfois même, le CL provient de membranes de cellules adjacentes. Dans ce cas précis, il s'agit du phénomène appelé efflux de cholestérol. Dans ce processus l'«ATP-Binding Cassette Transport Protein A1 » (ACBA1) joue un rôle majeur en effectuant des translocations de cholestérol du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire (Oram et Vaughan, 2000). En plus d'ABCA1, quatre autres acteurs sont connus pour avoir une implication dans cette voie métabolique. Ainsi, le *récepteur éboueur de type B classe I* (SR-BI) peut induire de l'efflux de cholestérol

en permettant aux HDL de se lier aux cellules et de réorganiser leurs lipides à partir des domaines enrichis en lipides de la membrane plasmique (Williams *et al.* 1999 ; de la Llera-Moya *et al.* 1999). Les cavéolines qui sont des protéines de 18 à 24 kDa généralement associées aux cavéoles (microdomaines de la membrane plasmique riches en cholestérol et en glycophospholipides) (Krajewska *et al.* 2004) peuvent aussi lier le cholestérol et le transporter du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique et enrichir ainsi les HDL en cholestérol (Murata *et al.* 1995 ; Smart *et al.* 1996). La 27-hydroxylase (CYP27A1) contribue aussi à l'efflux de cholestérol en transformant le cholestérol en 27-hydroxycholestérol (Escher *et al.* 2003), un oxystérol plus hydrophile qui peut donc diffuser plus facilement dans le sang. La lécithine cholestérol acyl-transférase (LCAT), qui hydrolyse les lécithines des HDL plasmatiques et estérifie le cholestérol de ces HDL à partir des acides gras libérés par son action, est une enzyme clef pour le métabolisme extracellulaire du cholestérol (Norum, 1977 ; Jonas, 1991). Ainsi elle pourrait faciliter la captation du cholestérol des tissus périphériques par les HDL en maintenant un gradient de concentration propice à l'efflux de cholestérol (Fielding, 1984).

Les HDL peuvent aussi céder leurs EC aux LDL et VLDL tout en recevant des TG de ces dernières par le biais de la CETP (*Protéine de transfert des esters de cholestérol*) qui est une enzyme de transfert de cholestérol (Lagrost *et al.*, 1990). C'est principalement ce phénomène d'échange de lipides qui est à l'origine des sous-classes de HDL dans la mesure où des variations de densité en sont la conséquence. Il arrive aussi que les HDL reviennent au foie afin de déverser leurs EC par le biais du processus de captation sélective (Jian *et al.*, 1998). On parle ici de transport inverse de cholestérol et, le caractère anti-athérogénique des HDL en est la résultante. Le principal constituant lipidique des HDL demeure les PL. Ces lipoprotéines présentent principalement à leur surface les apoA-I, C-II, C-III et E. Lors de la maturation des HDL, les apoC-II, C-III et E sont relâchées vers les lipoprotéines riches en TG et les HDL gagnent des apoA-II et A-IV, ce qui leur permet d'adopter une forme sphérique.

Les HDL<sub>3</sub> ont une taille de 70 à 90 Å, une densité de 1,125 à 1,210 g/ml et une composition d'environ 3% de TG, 13% d'EC, 4% de CL, 25% de PL et 55% de protéines. Les HDL<sub>2</sub>, quant à elles, ont une taille de 90 à 100 Å, une densité de 1,063 à 1,125 g/ml et présentent une composition d'environ 5% de TG, 17% d'EC, 5% de CL, 55% de PL et 40% de protéines (Pownall *et al.* 1999 ; Eisenberg, 1999).

### 1.3 Les Apolipoprotéines (apo) :

Le cœur lipidique hydrophobe des lipoprotéines, constitué d'EC et de TG, est recouvert d'une enveloppe amphiphile dont les constituants principaux sont les phospholipides, le cholestérol non-estérifié et les apolipoprotéines. Ces dernières confèrent à chaque édifice lipoprotéique ses propriétés fonctionnelles et son devenir métabolique. En effet, les apo régulent le métabolisme des lipoprotéines et déterminent le rôle unique de ces lipoprotéines dans le métabolisme des lipides (Mahley *et al.* 1984). En plus de ces deux rôles, les apo servent de cofacteurs des enzymes du métabolisme des lipides et permettent l'adressage des lipides aux différentes régions de l'organisme (Mahley *et al.* 1984). Les apoA, B, C, E représentent les classes principales. Le tableau II présente de manière synthétique les fonctions de ces apo, leur distribution et les tissus au sein desquelles elles sont observées.

Synthétisées dans les intestins, le foie, les apo A émanent de trois gènes différents, ceux des apo : A-I, A-II et A-IV. Alors que les apoA-I (28 kDa) et A-II (17 kDa) se localisent quasi-exclusivement dans les HDL, l'apoA-IV (46kDa) peut aussi s'associer aux lipoprotéines riches en triglycérides comme les chylomicrons (Redgrave, 1999). Un taux élevé de lipides dans le sang n'aurait pas d'effet sur la synthèse hépatique d'apoA-I (Davidson et Glickman, 1985). Cependant, au niveau intestinal, la synthèse d'apoA-I serait activée par une diète riche en lipides (Mahley *et al.* 1984). L'apoA-I a un rôle central dans le transport inverse du cholestérol depuis les cellules périphériques jusqu'au retour vers le foie.

**Tableau II** : Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines (Lagrost *et al.* 2003).

<b>Apo</b>	<b>Tissu</b>	<b>Distribution</b>	<b>Fonction</b>
<b>A-I</b>	Foie, (intestin	CM, HDL	Structurelle; activateur physiologique de la LCAT; efflux de cholestérol ;  Ligand de SR-BI
<b>A-II</b>	Foie, intestin	HDL	Structurelle; activateur/inhibiteur de la LH ; efflux de cholestérol ; Ligand de SR-BI
<b>A-IV</b>	Foie, intestin	CM, HDL	Transport inverse du cholestérol; activateur de la LCAT; métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides ; Ligand de SR-BI
<b>B-100</b>	Foie	VLDL, IDL, LDL	Structurelle: synthèse et sécrétion des VLDL ; ligand du rLDL ; Ligand de SR-BI
<b>B-48</b>	Intestin	CM	Structurelle; synthèse et sécrétion des chylomicrons ; Ligand de SR-BI
<b>C-I</b>	Foie (intestin)	CM, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP : activateur de la LCAT ; inhibiteur de la liaison au rLDL
<b>C-II</b>	Foie (intestin)	CM, VLDL, HDL	Activateur physiologique de la LPL
<b>C-III</b>	Foie (intestin)	CM, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la LPL ; inhibiteur de la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG. Ligand de SR-BI
<b>D</b>	Foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport inverse du cholestérol
<b>E</b>	Foie, macrophage, cerveau	CM, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs rLDL, LRP et SR-BI

Les particules de HDL contenant l'apoA-I peuvent récupérer l'excès de cholestérol de ces cellules périphériques grâce surtout au système membranaire transporteur ABCA1, tel que mentionné précédemment. L'apoA-I est aussi connue comme un activateur physiologique de la LCAT (Fielding *et al.* 1972). Cette dernière ayant pour rôle d'estérifier le cholestérol pris en charge par les HDL lors du processus d'efflux de cholestérol (Jonas *et al.* 1993). À l'inverse, l'apoA-II aurait un caractère pro-athérogène à cause de son effet négatif dans les processus liés au métabolisme des HDL. Ayant une plus grande affinité que l'apoA-I pour les sites de fixation sur la HDL, elle peut provoquer son déplacement (Mao *et al.* 1981). Cet événement engendre une diminution de l'activation de la LCAT et une réduction de l'efflux de cholestérol (Durbin *et al.* 1981). Plusieurs études démontrent que l'apoA-II affecterait le métabolisme des HDL par activation de la LH « Lipase hépatique » (Jahn *et al.* 1983 ; Nishida *et al.* 1986) La CETP semble être inactivée par l'apoA-II (Zhong *et al.* 1994 ; Lagrost *et al.* 1995).

L'apoB, l'apo primaire des chylomicrons, VLDL, IDL et LDL est hétérogène et existe sous deux formes : apoB-100 et apoB-48. L'apoB-100 (512 kDa) est synthétisée par le foie et est le constituant obligatoire des VLDL, IDL et LDL. Quant à l'apoB-48 (242 kDa), elle est produite dans l'intestin et est retrouvée dans les chylomicrons et les résidus de chylomicrons (Mahley *et al.* 1984). Il est à noter que l'apoB-100 possède un domaine C-terminal nécessaire à sa liaison au rLDL, à la différence de l'apoB-48 qui en est la forme tronquée et qui n'interagit pas avec le rLDL. L'apoB-100 et l'apoB-48 proviennent du même ARN messager. La formation de l'apoB-48 résulte de l'insertion d'un codon stop UUA dû au remplacement du C par un U au codon CAA codant pour la Glutamine à la position 2153 dans l'ARNm de l'apoB-100. Cette conversion de cytidine en uridine requiert un complexe enzymatique dont l'APOBEC-1 « apoB mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide1 » étant une « cytidine déaminase » de 27 kDa qui constitue la sous-unité catalytique (Davidson et Shelness, 2000). La réaction catalysée par ce complexe a

donc pour effet l'arrêt de la traduction, puis la production de l'apoB-48 dans l'intestin (Chen *et al.* 1987).

Les apoC sont des protéines de faible poids moléculaire. Nommées apoC-I, C-II et C-III, ce sont les composants de surface des chylomicrons, VLDL et HDL. Étant reconnues comme agent présentant des rôles métaboliques importants, des études ont rapporté que l'apoC-I (6,6 kDa) se révèle être un inhibiteur physiologique de la CETP (Gautier *et al.* 2002); activateur de la LCAT (Soutar *et al.* 1975); inhibiteur de la liaison aux rLDL, LRP et rVLDL (Kowal *et al.* 1990). L'apoC-II (8,8 kDa) est un activateur physiologique de la LPL (Goldberg *et al.* 1990). Elle empêche, à moindre titre que l'apoC-I, la liaison entre l'apoE des VLDL et les rLDL et LRP (Weisgraber *et al.* 1990). Finalement, l'apoC-III (8,9 kDa) a pour propriété l'inhibition physiologique de la LPL et de la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG (Packard *et al.* 1999).

L'apoE (34 kDa) est un constituant des chylomicrons, VLDL, et de certaines classes de HDL. L'apoE possède une très forte affinité pour le rLDL, la LRP et permet un rendement catabolique plus grand en comparaison avec une lipoprotéine présentant de l'apoB-100 (Mahley *et al.* 1984).

#### **1.4 Le Récepteur de LDL (rLDL)**

##### 1.4.1 Structure et fonction

Le rLDL est une glycoprotéine de 839 acides aminés (160 kDa) retrouvée à la surface des cellules. La protéine mature présente de nombreux liens disulfures qui augmentent grandement sa stabilité. Ce récepteur associé à un puits de clathrine, lie et internalise les lipoprotéines plasmatiques présentant à leur surface l'apoB-100 ou l'apoE. Ainsi, le rLDL reconnaît les LDL, les IDL et les résidus de CM (Brown *et al.* 1981). L'affinité du rLDL est plus grande pour les lipoprotéines contenant l'apoE, simplement parce que l'apoE est habituellement présente en plusieurs copies à la

surface des IDL, alors que l'apoB-100 n'est présente qu'en une seule copie à la surface des LDL (Pitas *et al.* 1980). Même si elles contiennent de l'apoB-100, les VLDL sont de pauvres ligands du rLDL, probablement à cause de la conformation particulière que prend l'apoB-100 sur ces lipoprotéines (Soutar, 1999). Ce récepteur joue donc un rôle central dans l'homéostasie du cholestérol. Puisque les taux plasmatiques de cholestérol-LDL jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose, l'activité de ce récepteur a une influence sur la susceptibilité d'un individu à développer une MCV (maladie cardiovasculaire) (Pitas *et al.* 1980 ; Brown et Goldstein, 1986).

#### 1.4.2 Synthèse et cycle du rLDL

Le récepteur est synthétisé dans le réticulum endoplasmique rugueux sous la forme d'un précurseur qui subit une maturation dans l'appareil de Golgi. Le récepteur est transporté jusqu'à la surface de la cellule où il est disponible pour lier une lipoprotéine. Lorsqu'une particule se lie au récepteur, le complexe récepteur/lipoprotéine migre dans un puit tapissé de clathrine où il est internalisé. Un lysosome fusionne alors avec l'endosome contenant le complexe, ce qui entraîne une baisse du pH de l'endosome. La particule est alors dissociée du récepteur pour être dégradée. Le récepteur est recyclé à la surface de la cellule, où il peut répéter le cycle d'internalisation. La dégradation de la partie protéique de la lipoprotéine fournit des acides aminés, et celle des EC produit du CL et des acides gras qui peuvent être immédiatement utilisés ou être estérifiés pour entreposage (Soutar, 1999 ; Goldstein *et al.* 2000).

La synthèse du rLDL est soumise à un processus de contrôle par rétroinhibition qui a pour principal but de stabiliser la composition lipidique des membranes cellulaires (Goldstein *et al.* 2000). Le cholestérol intracellulaire est le principal agent contrôlant l'expression du rLDL. Ainsi, si la cellule manque de cholestérol, elle synthétisera des récepteurs afin d'aller chercher le cholestérol manquant en circulation. C'est par ce

mécanisme qu'agissent certains agents hypocholestérolémiant, telles que les statines, qui empêchent la synthèse endogène du cholestérol réalisée par la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase « HMG CoA red », forçant la cellule à aller chercher le cholestérol en circulation. Ce mécanisme de contrôle impliquant le cholestérol est médié par les protéines liant l'élément de réponse aux stérols « SREBP », des protéines qui activent la transcription du gène du rLDL lors de disette en cholestérol (Goldstein *et al.* 2000). Au contraire, s'il y a excès de cholestérol, le stockage de ce dernier est réalisé sous forme d'EC. L'enzyme responsable de cette réaction est l'Acyl CoA cholestérol acyltransférase « ACAT » (Brown *et al.* 1986).

Il est important de noter que les voies métaboliques indépendantes du rLDL contribuent à 42% de la clairance du cholestérol lié aux LDL chez les humains (Dietschy *et al.* 1993).

### ***1.5 La Captation sélective***

Avant même le clonage et l'identification de SR-BI (responsable de la captation sélective des EC) par le groupe du Dr Krieger (Acton *et al.* 1994), quelques informations étaient déjà disponibles à propos du phénomène de captation sélective.

Le processus de captation sélective ne réfère pas à la gestion complète d'une lipoprotéine mais vise les EC contenus dans les lipoprotéines sans affecter la sous unité protéique de ces dernières (Pittman *et al.* 1987). Il s'en suit un transfert irréversible à travers la cellule (Knecht et Pittman, 1989). La vitesse et la fréquence de la captation sélective sont régulées par deux paramètres importants qui sont la taille des lipoprotéines fournissant les EC et la concentration de CL dans la membrane (Knecht et Pittman, 1989 ; Green et Pittman, 1991). Dans le passé, il a été suggéré que les EC étaient insérés dans une invagination (membrane pool) de la membrane contenant du plasma pour ensuite être internalisés de manière irréversible (Knecht et Pittman, 1989). Toutefois, des études plus récentes suggèrent plutôt un

mécanisme de rétroendocytose (Silver *et al.* 2001) (Rhainds *et al.* 2004). D'autres études sont nécessaires pour éclaircir le phénomène.

Au début la captation sélective n'était connue que pour les HDL. Mais avec le temps, les études surtout effectuées par notre groupe de recherche ont montré que la captation sélective était aussi possible pour les VLDL (Brissette *et al.* 1999), les IDL (Brissette et Falstrault, 1994), les LDL natives (Charest *et al.* 1999) et les LDL modifiées (Rhainds *et al.* 1999).

#### 1.5.1 Le SR-BI appartient à la famille des récepteurs éboueurs

Premièrement isolé et identifié comme récepteur « éboueur » chez les rongeurs (Acton *et al.* 1994), SR-BI fait partie de la classe B, comprenant le Cluster of differentiation 36 « CD36 » (Greenwalt *et al.* 1992) et la protéine membranaire lysosomiale II « LIMPII » (Vega *et al.* 1991). Chacun de ces récepteurs est capable de lier les LDL natives et modifiées (Acton *et al.* 1994). Chez l'humain, un homologue CLA-1 a été identifié et caractérisé (Calvo *et al.* 1993 ; Murao *et al.* 1997). Il a été découvert que ce récepteur présentait une forte affinité pour les HDL et les LDL (Acton *et al.* 1996). Présentant de très fortes ressemblances avec son orthologue chez les rongeurs (Murao *et al.* 1997), la nomenclature a accepté l'usage du nom SR-BI humain en référence à CLA-1.

#### 1.5.2 Expression tissulaire et cellulaire de SR-BI

Le SR-BI est exprimé dans tous les tissus aptes à capter sélectivement les EC des HDL et LDL, c'est-à-dire dans les tissus stéroïdogènes (testicules, ovaires, surrénales) chez l'homme (Murao *et al.* 1997). Il est également exprimé dans l'intestin (Johnson *et al.* 1998), le tissu adipeux, les poumons et le foie (Acton *et al.* 1994). Au niveau cellulaire, on le trouve majoritairement concentré dans les cavéoles, qui définissent à la surface cellulaire des microdomaines enrichis en cholestérol et en

glycolipides et auxquels est associé une protéine signature : la cavéoline-1, tel que mentionné précédemment (Graf *et al.* 1999). Ces cavéoles faciliteraient le rôle de SR-BI dans le transfert des EC entre les lipoprotéines et les cellules (Babitt *et al.* 1997), et au foie (Graf *et al.* 1999). Il est à noter que les hépatocytes présentent peu de cavéoles (Fielding et Fielding, 2000). En ce qui concerne l'expression de la cavéoline-1, Li et al. (2001) en retrouvent de plus faibles quantités dans les hépatocytes que dans les autres tissus.

### 1.5.3 Structure de la protéine

Le gène de SR-BI a été mis en évidence chez le hamster, le rat, la souris et l'homme (Rigotti *et al.* 1997). Il est localisé sur le chromosome 12 chez l'homme et chez le rat, ce qui confirme que CLA-1 et SR-BI représentent des gènes homologues (Acton *et al.* 1996). Ce gène est hautement conservé dans les différentes espèces étudiées (rongeurs, homme) (Johnson *et al.* 1998). Il s'agit d'une protéine transmembranaire de 509 acides aminés (85 kDa), constituée d'une large boucle extracellulaire ancrée dans la membrane à chaque extrémité par un domaine transmembranaire. Il semblerait que cette boucle soit impliquée dans le transport sélectif de lipides (Rigotti *et al.* 1997) car elle contient de nombreuses cystéines, des sites de glycosylation et des sites d'acylation (Babitt *et al.* 1997). Enfin, le domaine intracellulaire de SR-BI est composé de sites de phosphorylation pour différentes kinases capables de contrôler l'activité de SR-BI (Johnson *et al.* 1998).

### 1.5.4 Rôles de SR-BI dans le métabolisme du cholestérol

Les rôles multiples de SR-BI dans le métabolisme lipidique ont été caractérisés par diverses approches méthodologiques: surexpression ou invalidation du gène SR-BI chez la souris.

*SR-BI favorise l'entrée sélective des esters de cholestérol des HDL et des LDL dans les cellules.*

Un grand nombre d'études visant à préciser le rôle exercé par SR-BI a été réalisé depuis qu'Acton *et al.* (1999) ont montré pour la première fois que SR-BI avait une certaine implication dans le phénomène d'entrée sélective des EC-HDL dans des cellules d'ovaire de hamster chinois « CHO ». Par exemple, il a été prouvé que l'entrée du cholestérol et sa conversion en hormones stéroïdiennes dans les cellules des glandes surrénales pouvaient être inhibées *in vitro* par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la boucle extracellulaire de SR-BI (Temel *et al.* 1997). De plus, si on met le SR-BI en présence de divers ligands (LDL, LDL oxydées, LDL acétylées), l'entrée des EC de HDL dans des hépatocytes de rat est inhibée (Temel *et al.* 1997). Enfin, chez des souris déficientes en SR-BI, une diminution du contenu cellulaire en cholestérol dans les cellules des glandes surrénales a été remarquée (Rigotti *et al.* 1997). Toutes ces expériences suggèrent que le SR-BI pourrait contrôler l'entrée sélective des EC-HDL au niveau du foie et des cellules stéroïdogènes. Depuis ces études, les recherches au sein du laboratoire du Dr Louise Brissette à l'Université du Québec à Montréal ont pu révéler que la captation sélective médiée par le récepteur SR-BI n'est pas exclusive aux HDL, mais se fait aussi à partir de LDL (Rhains *et al.* 2003 et Brodeur *et al.* 2005).

*SR-BI contrôle la concentration plasmatique des HDL, des VLDL et des LDL.*

Des expériences ont démontré une augmentation de la cholestérolémie chez des souris SR-BI KO (Rigotti *et al.* 1997). De plus, une augmentation de la concentration plasmatique des HDL est remarquée quand l'expression hépatique de SR-BI baisse d'environ 50% (Varban *et al.* 1998). Dans le cas contraire, si on surexprime le SR-BI dans le foie, on observe une forte diminution de la concentration de HDL-EC, de VLDL-EC et de LDL-EC (Wang *et al.* 1998 ; Kozarsky *et al.* 1997). Le fait qu'on observe une réduction de 80% de l'étendue des lésions aortiques, associée à la

diminution des concentrations plasmatiques des HDL, des VLDL et des LDL lorsqu'on surexprime le SR-BI dans le foie de souris KO en rLDL suggère que la surexpression hépatique de SR-BI pourrait avoir un puissant effet antiathérogène (Arai *et al.* 1999).

Un certain nombre d'expériences réalisées *in vitro* ont montré que le SR-BI intervenait aussi dans les échanges bidirectionnels de CL entre les cellules et le plasma (Rothblat *et al.* 1999). SR-BI interviendrait plutôt dans la redistribution du cholestérol dans la membrane cellulaire, favorisant ainsi le flux sortant de cholestérol (Rothblat *et al.* 1999). SR-BI pourrait donc exercer une fonction dans l'étape initiale du transport inverse du cholestérol, mais aucune confirmation physiologique n'est venue étayer cette hypothèse (Mizutani *et al.* 1997).

#### 1.5.5 Régulation de l'expression de SR-BI

Mizutani *et al.* (1997) ont démontré lors de leur étude sur l'induction hormonale de l'expression de gènes dans les ovaires de rattes, que les taux d'ARNm de SR-BI augmentaient fortement après un traitement par l'hormone gonadotrope sérique de jument gravide « PMSG » et la gonadotrophine chorionique humaine « hCG ». De plus, dans les tissus stéroïdogènes, l'expression de SR-BI est augmentée lorsque la concentration intracellulaire du cholestérol est diminuée, soit par la réduction de l'apport de cholestérol à la cellule par les HDL ou les LDL (Wang *et al.* 1996 ; Vieira-Van Bruggen *et al.* 1998), soit par une stimulation de la stéroïdogénèse (Reaven *et al.* 1998 ; Ng *et al.* 1997). Ainsi, l'expression de SR-BI et la production d'hormones stéroïdes peuvent être coordonnées (Landschultz *et al.* 1996 ; Rigotti *et al.* 1996). Chez le hamster, dans le foie, l'expression de SR-BI n'est pas altérée par un régime faiblement enrichi en cholestérol (0,1%) même si ce régime entraîne une forte augmentation (10 fois) des stocks hépatiques d'EC (Woollett *et al.* 1997). De même, l'absence de HDL normales dans le plasma de souris homozygotes déficientes en apoA-I n'entraîne pas d'augmentation de l'expression de SR-BI, suggérant que

celle-ci n'est pas contrôlée par le flux entrant de cholestérol dans le foie (Wang *et al.* 1996 ; Spady *et al.* 1998). Cependant, un régime très riche en cholestérol (2%) entraîne, chez le rat, des variations d'expression de SR-BI en fonction du type cellulaire étudié. En effet, les auteurs ont observé une diminution de la quantité en SR-BI dans les cellules parenchymateuses (hépatocytes) et une augmentation de la quantité en SR-BI au niveau des cellules de Kupffer qui appartiennent à la population cellulaire non parenchymateuse (Fluiter *et al.* 1997). Cette différence suggère que le SR-BI exerce une fonction différente selon sa localisation cellulaire : médiateur de l'entrée sélective de cholestérol des HDL et des LDL dans l'hépatocyte, médiateur du flux sortant de cholestérol vers les HDL et LDL dans les cellules de Kupffer.

### **1.6 Les Transporteurs d'acides gras**

Avant que les acides gras soient captés par les Fatty acid binding protein « FABP », il existe plusieurs transporteurs protéiques associés à la membrane jouant un rôle important dans la captation extracellulaire des acides gras (Hui *et al.* 1997 ; Abumrad *et al.* 1999). Il a été prouvé que la protéine de transfert des acides gras « FATP » (63 kDa) contribue fortement à la capture des acides gras dans les adipocytes (Schaffer et Lodish, 1994). En effet, les taux de captation des acides gras correspondent avec l'expression de la FATP et ce même si cette protéine n'a pas été observée liée aux acides gras et qu'aucun site de liaison à ces particules n'a été identifié (Pohl *et al.* 2004). La Translocase des acides gras « FAT » 88 kDa, homologue chez le rat du CD36 humain, contribue aussi à ce phénomène (Abumrad *et al.* 1993). Quant à l'albumine, qui est le transporteur extracellulaire par excellence des acides gras à longue chaîne, c'est la plus représentée des protéines plasmatiques et sa contribution à ce phénomène de captation est inéluctable (Tiruppathi *et al.* 1996 ; Cessac-Guillemet *et al.* 1996). La cavéoline (22 kDa), qui est une protéine structurale des cavéoles (Rothberg *et al.* 1992) et qui est impliquée dans la potocytose médiée par les récepteurs (Anderson *et al.* 1992), présente aussi une forte affinité envers les acides

gras dans les adipocytes (Trigatti *et al.* 1991). Le couple SCP-2/SCP-x, de la famille des « Sterol Carrier Protein ou protéines transporteuses des stérols » est responsable du maintien des taux intracellulaires de cholestérol, spécialement dans les tissus comme les intestins, le foie et les tissus stéroïdogéniques qui utilisent de fortes quantités de cholestérol (Schroeder *et al.* 1998). SCP-2 a aussi la faculté de lier les acides gras et acyl-CoA ramifiés ou non. Ce SCP-2 augmenterait la captation des acides gras et leur transport intermembranaire (Starodub *et al.* 2000). Il est fort possible que toutes ces protéines facilitent le transport des acides gras liés à l'albumine à travers l'endothélium, l'espace interstitiel, et la membrane plasmique.

## **1.7 La L-FABP**

### 1.7.1 Le gène

La L-FABP (ou FABP1) est un membre de la famille des « fatty acid-binding protein » cytosoliques (FABP) qui sont retrouvées dans le foie, les intestins, les reins. La L-FABP a un poids moléculaire de 14,2 kDa et avec sa forte expression hépatique (2 à 5%) est la protéine cytosolique la plus retrouvée dans le foie (Bordewick *et al.* 1989 ; Glatz *et al.* 2001; Thompson *et al.* 1999). Cependant, dans le foie, parmi la famille des FABP, seule la L-FABP est retrouvée. Sa demi-vie a été estimée à 3,1 jours (Bass *et al.* 1985). La L-FABP est connue pour lier les acides gras et quelques autres molécules hydrophobes que nous décrirons plus tard. Il a été remarqué que ses niveaux d'expression correspondent au métabolisme lipidique (Glatz *et al.* 2001). Compte tenu de ces informations, il est inévitable de postuler que la L-FABP contribue considérablement à la liaison des lipides au niveau hépatique et ainsi au métabolisme lipidique. Ainsi, les hépatocytes sur-exprimant la L-FABP montrent une augmentation des taux de la captation d'acides gras (AG) et de leur estérification (Murphy *et al.* 1996). De plus, dans les mêmes conditions, des augmentations des taux de phospholipides et des EC ont été remarquées (Jefferson *et al.* 1990). Enfin, des études ont révélé que la surexpression de la L-FABP dans des cellules hépatiques

de type McA-RH7777 en présence d'acide palmitique, entraîne une diminution de synthèse des TG tout en augmentant la  $\beta$ -oxydation et la sécrétion d'apoB-100 (Linden *et al.* 2002). Les hépatocytes HepG2 exprimant un ARN antisens de la L-FABP révèlent une réduction de la captation des acides gras (Wolfrum *et al.* 1999). De plus, d'autres études ont révélé qu'une ablation du gène de la L-FABP chez la souris causait une accumulation de cholestérol au niveau du foie et augmentait la propension du cholestérol provenant de la diète à engendrer un gain de poids (Martin *et al.* 2006).

### 1.7.2 Ligands

Comme son nom l'indique, la L-FABP lie les acides gras, à longue chaîne de préférence, mais aussi les acyl CoA. Les ligands endogènes de L-FABP sont nombreux : hème, bilirubine, les stéroïdes et leurs métabolites, sels biliaires, acides gras oxydés ou peroxydés, leukotriènes et prostaglandines (Bernlohr *et al.* 1997 ; Bass, 1998 ; Storch *et al.* 2000), mais la capacité de la L-FABP à lier le cholestérol ne serait pas clairement établie (Thumser *et al.* 1996). En effet, plusieurs études ont démontré que le cholestérol ne pouvait être un des ligands de la L-FABP (Bass *et al.* 1985 ; Vincent *et al.* 1985, Schroeder *et al.* 1998). Au contraire des autres FABP qui ne lient qu'un acide gras à la fois, chaque molécule de L-FABP est capable de lier deux molécules d'acide gras (Thompson *et al.* 1997). Les proliférateurs de péroxysomes comme le bezafibrate et clofibrate se lient aussi à la L-FABP (Bernlohr *et al.* 1997 ; Bass, 1998).

### 1.7.3 Régulation

Généralement, les hormones, la diète, certains agents pharmacologiques et tous les proliférateurs de péroxysomes régulent l'expression de la L-FABP dans le foie (Carlsson *et al.* 2001 ; Carlsson, 2002). En effet, la régulation à la hausse la plus marquée a été due à l'administration de proliférateurs de péroxysomes comme les

médicaments hypolipémiants, phtalates, esters plastifiants, divers herbicides, clofibrates et analogues. Tous sont composés d'une chaîne hydrophobe liée à une fonction carboxylique (Kaikaus *et al.* 1993). Les taux d'ARNm de L-FABP et la capacité de liaison de ces protéines semblent augmenter après un traitement à l'hormone de croissance (GH) (Berry *et al.* 1993 ; Singer *et al.* 1996).

#### 1.7.4 Rôle et implications

A part la principale activité connue de la L-FABP qui est le transport des acides gras à longue chaîne, la communauté scientifique a constaté que cette protéine possède d'autres rôles physiologiques. En effet, la L-FABP est impliquée dans les processus d'oxydation mitochondriale et péroxysomale des acides gras à longue chaîne. Antonenkov *et al.* (2005) suggèrent que la L-FABP joue un rôle dans la liaison et la solubilisation du stock d'acides gras non estérifiés dans le compartiment péroxysomal. L'étude réalisée révèle une stimulation de la  $\beta$ -oxydation du palmityl-CoA et de l'activité de l'Acyl-CoA thioestérase par la L-FABP. De plus Veerkamp & Van Moerkerk, (1993) ont aussi constaté que les niveaux de L-FABP corrélaient avec les taux de  $\beta$ -oxydation. Erol *et al.* (2003) ont observé une diminution de l'oxydation des LCFA « acides gras à longue chaîne » dans des hépatocytes de souris déficientes en L-FABP. Aussi, cette même protéine est impliquée dans la transformation des acides gras en triglycérides (Ashtaves *et al.* 2004). Les acides gras à longue chaîne et leurs dérivés ou métabolites sont liés par la L-FABP puis acheminés jusqu'au noyau où ils fixent des récepteurs comme les PPAR « récepteurs au facteur activé de prolifération des peroxysomes » qui sont connus pour réguler la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et la différenciation cellulaire (Schroeder *et al.* 2001 ; Schroeder *et al.* 2008). Il a aussi été suggéré que la L-FABP achemine les acides gras vers les membranes cellulaires par diffusion en milieu aqueux à la différence des autres FABP (Thumser et Torch, 2000). Ainsi la L-FABP pourrait jouer un rôle important dans le processus de régulation de la transactivation

ligand-dépendante des PPAR $\alpha$  via une interaction protéine-protéine avec les PPAR $\alpha$  dans le noyau (Linden *et al.* 2002). Les PPARs sont des récepteurs nucléaires hormonaux qui forment un complexe hétérodimérique avec le « 9-cis-retinoid acid receptor » ou le RXR « Récepteur X rétinoïde » et lient des séquences spécifiques de l'ADN qui sont des régions promotrices de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique incluant ceux de FAT/CD36, L-FABP, Acyl CoA Synthétase (Issemann *et al.* 1990 ; Keller *et al.* 1993 ; Desvergne *et al.* 1999). Pour les trois types de PPAR recensés (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  et PPAR $\delta$ ), les acides gras à longue chaîne activent principalement les formes PPAR $\alpha$  et PPAR $\delta$  (Kersten *et al.* 1999). Il a été démontré que les proliférateurs de peroxyssomes qu'ils soient naturels ou synthétiques augmentent la synthèse de la L-FABP. L'influence de tels facteurs, à travers l'activation des PPAR $\alpha$ , se manifeste par la régulation de la synthèse d'une grande variété de protéines incluant les enzymes de la  $\beta$ -oxydation (Reddy, 2004).

Certaines études effectuées chez la souris ont démontré que la L-FABP interviendrait dans le processus de transport intermembranaire du cholestérol *in vitro* en permettant son transfert des vésicules aux microsomes (Schroeder *et al.* 1989 ; Schroeder *et al.* 1991). Une très grande partie du cholestérol cellulaire (90%) est localisée dans les domaines membranaires riches en sphingomyéline (Schroeder *et al.* 1991). Les raisons de cette colocalisation ne sont pas connues mais elles semblent résulter du fait que le cholestérol a une plus grande affinité pour la sphingomyéline que pour les autres phospholipides membranaires. La sphingomyéline jouerait un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol (Pörn et Slotte, 1995). Ainsi, la dégradation de la sphingomyéline membranaire par de la sphingomyélinase exogène provoque une estérification du cholestérol intracellulaire et une diminution de sa biosynthèse, alors qu'il en est tout autrement pour la dégradation spécifique de la phosphatidylcholine (Schroeder et Nemezc, 1989). Aussi, Jefferson *et al.* (1991) ont constaté une forte augmentation de la formation de cholestérol estérifié chez des fibroblastes surexprimant la L-FABP traités avec de la sphingomyélinase exogène. La

dissociation cholestérol/sphingomyéline ainsi que la forte expression de la L-FABP engendreraient un plus grand déplacement du cholestérol membranaire vers des compartiments intracellulaires et de plus fortes modulations dans le transport du cholestérol de la membrane au réticulum. De plus, selon Jefferson *et al.* (1991), une surexpression de la L-FABP dans des cellules en culture augmente la captation du cholestérol et la masse intracellulaire d'EC tout en facilitant le transfert intermembranaire de stérols. Pour se faire, la L-FABP doit se lier à des domaines spécifiques de la membrane. La L-FABP augmente le transfert de stérols *in vitro* entre la membrane donneuse et l'accepteuse séparées par une membrane de dialyse même si cette dernière est imperméable à la L-FABP. Cela implique ainsi que cette protéine n'effectue pas de transfert intermembranaire de stérols comme un transporteur en milieu aqueux (Jefferson *et al.* 1991).

La L-FABP possède deux sites de liaison lui permettant de lier deux acides gras (Thompson *et al.* 1999). La disposition de ses sites de liaison lui permet de lier des résidus plus gros comme le cholestérol (Thumser *et al.* 1996). Ainsi, un blocage chimique ou une modification au niveau d'un des sites de liaison de cette protéine provoque un arrêt du transfert intermembranaire des stérols (Woodford *et al.* 1995) et affecte négativement la participation de la L-FABP au processus de captation du cholestérol (Jefferson *et al.* 1991). La L-FABP participe *in vitro* au processus d'estérification du cholestérol exogène catalysé par l'ACAT en lui transférant les LCFA-CoA ou le cholestérol qu'elle a préalablement lié (Schroeder *et al.* 1989 ; Chao *et al.* 2002). Les LCFA-CoA sont une source d'énergie pour la  $\beta$ -oxydation dans la mitochondrie et les peroxysomes. Ils sont impliqués dans la formation des lipides de stockage d'énergie (TG) et des phospholipides membranaires (Ves-Losada et Brenner, 1996). La L-FABP apporte une contribution physiologique déterminante quant à la capacité de liaison des LCFA-CoA et à la distribution des LCFA-Acyl-CoA et des AG estérifiés (Martin *et al.* 2003).

### 1.8 Buts et objectifs généraux

Le but principal de cette étude était de déterminer l'influence de la captation sélective, donc de l'activité de SR-BI sur l'expression de la L-FABP. Ceci reposait sur la démonstration faites par notre groupe que la sur-expression de SR-BI dans la cellule HepG2 était associée à une hausse de la L-FABP (Rhainds *et al.* 2004). Puisque la captation sélective des EC fournit des acides gras, notre hypothèse était que l'expression de la L-FABP serait influencée par les acides gras dérivés des EC provenant des lipoprotéines par le biais de SR-BI. Ainsi, la L-FABP travaillerait de concert avec SR-BI pour la captation des EC des lipoprotéines. Pour ce faire, une exposition de cellules HepG2 à des LDL-EC a été effectuée, les ARNm, et les protéines ciblées ont été soumis à une estimation de leurs niveaux tout au long de ce traitement afin de rechercher une éventuelle modulation de leur expression.

En second lieu, comme décrit à la section précédente, la L-FABP est peu connue pour sa capacité à lier le cholestérol (Jefferson *et al.* 1991), mais elle peut activer le transfert des stérols *in vitro* (Murphy *et al.* 1996). On peut donc supposer que la L-FABP fonctionne de concert avec le SR-BI en tant qu'accepteur d'EC et que son expression est régulée par le flot d'EC ou celui des AG ou finalement par le CL produit par hydrolyse. L'influence de la L-FABP sur le phénomène de captation sélective mériterait d'être investiguée au même titre que son impact sur l'hydrolyse des EC. Afin de répondre à l'objectif d'étude portant sur la captation sélective et l'implication de la L-FABP dans ce processus, une surexpression de la L-FABP dans des cellules HepG2 a été réalisée, puis des essais d'association ont été réalisés sur ces dernières et sur des contrôles. Pour ce faire, des lipoprotéines radioactives ont été mises en contact avec les cellules, puis le lysat cellulaire a été compté de façon à déterminer la proportion de lipoprotéines associées aux cellules. Par ailleurs, une interférence à l'ARNm de la L-FABP a été tentée dans des cellules HepG2 dans le but de les soumettre à des essais d'association et de déterminer leur taux de captation

sélective. Ainsi, en visualisant ces paramètres en sur et sous expression de la L-FABP, il devait être possible de déterminer la contribution apportée par la protéine à ce processus. De plus, une surexpression de la L-FABP par des agonistes des PPAR $\alpha$  a été tentée dans le but de visualiser par un autre moyen, l'impact d'une forte quantité de L-FABP dans la cellule sur son profil lipidique et la captation sélective des EC. Sachant que la L-FABP peut transporter des stérols, une autre étude a été réalisée dans le but de vérifier une participation de cette protéine dans le phénomène d'hydrolyse des EC. Ainsi, des lipoprotéines radioactives ont été mises en contact avec des cellules exprimant la L-FABP et SR-BI à différents niveaux, puis les lipides cellulaires extraits ont été chargés sur des plaques de silice en vue d'une chromatographie dans le but de séparer les lipides. Puis une estimation de l'efficacité d'hydrolyse a été menée à bien en quantifiant le cholestérol libre et estérifié grâce à la radioactivité. Au cours de la même expérience, un prétraitement à la chloroquine a été réalisé afin de déterminer un possible impact de l'expression de la L-FABP sur les taux d'hydrolyse lysosomale et extralysosomale.

## 2 METHODOLOGIE

### 2.1 *Matériel*

Le plasma humain pour l'isolement des lipoprotéines est acheté chez Bioreclamation (Hicksville, New York, USA). Le milieu de culture cellulaire MEM (milieu essentiel minimal) vient de Life Technologies Gibco BRL (Burlington, Ontario, Canada) et la trousse destinée à la réaction PCR provient de New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA). La G418 ou Généticine utilisée comme agent de sélection a été obtenue de Calbiochem (Mississauga, Ontario, Canada). Les anticorps anti L-FABP et anti SR-BI ont été achetés chez Abnova Corporation (Nieuwenhuis, Taipei, Taiwan) et Novus Biologicals (Burlington, Ontario, Canada). Les amorces de PCR viennent d'Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada) et les séquences siRNA ont été obtenues chez Qiagen (Mississauga, Ontario, Canada). Le [<sup>3</sup>H] cholestérol oléyl éther (30-60 Ci/mmol) provient d'ICN (Biomédical Montréal, Québec, Canada), le [<sup>3</sup>H] cholestérol oléate est acheté chez Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) et l'iode-125 [<sup>125</sup>I] est vendue sous forme d'iodure de sodium (100 mCi/ml) par Amersham (Oakville, Ontario, Canada). Les films d'autoradiographie HYBLOT CL ont été achetés chez DENVILLE Scientific Inc. (Metuchen, NJ, USA).

### 2.2 *Isolement des lipoprotéines*

Les lipoprotéines sont isolées à partir du plasma humain. Avant l'isolement, pour inhiber l'activité des protéases, le plasma est ajusté à 0,01% d'EDTA, 0,02% d'azoture de sodium, 10 µM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), et 10 µM de Trolox. Selon la méthode proposée par Hatch et Lees (1968), les LDL humaines dont la densité varie entre 1,025–1,063 g/ml et les HDL<sub>3</sub> pour lesquelles, la densité oscille entre 1,125–1,21 g/ml, sont séparées par ultracentrifugation après

ajustement de la densité du plasma par ajout de NaBr. Le plasma est d'abord ajusté à 1,025 g/ml, puis après centrifugation à 2 300 000 g x h à 16°C, la phase supérieure qui contient les particules dont la densité est inférieure à 1,025, est éliminée. Le sous-nageant est conservé et ajusté à 1,063 g/ml de densité avant d'être à son tour centrifugé à 16°C à 2 300 000 g x h. On procède ensuite à la récupération des LDL qui se retrouvent ainsi en surface. Le plasma restant est ajusté à 1,125 g/ml puis centrifugé à 3 000 000 g x h à 16°C. Le sous-nageant en résultant est conservé, ajusté à 1,21 g/ml puis centrifugé à 4 600 000 g x h à 16°C de façon à ce que les HDL se retrouvent en surface. Après avoir été récupérées les HDL et LDL sont dialysées dans un tampon tris salin (TBS) (10 mM de Tris à pH 7,4 contenant 150 mM de NaCl) afin d'éliminer l'excès de sel.

### 2.3 *Marquage des lipoprotéines.*

Les LDL et les HDL<sub>3</sub> sont iodées par une modification (Langer *et al.* 1972) de la méthode de McFarlane (McFarlane, 1948). Un millicurie d'I<sup>125</sup> est utilisé pour ioder 2,5 mg de LDL ou de HDL<sub>3</sub> en présence of 30 nmoles (10 nmoles pour HDL<sub>3</sub>) de monochlorure d'iode dans 0,5 M de glycine-NaOH à pH 10. L'iode libre est séparée par filtration moléculaire sur gel de Séphadex G-25. Il s'en suit une dialyse dans du TBS. La radioactivité spécifique se situe généralement entre 100 000 et 250 000 cpm/μg de protéine. Les LDL et HDL<sub>3</sub> sont marquées avec du [<sup>3</sup>H]-cholestérol oléyl éther (non hydrolysable) (<sup>3</sup>H-ECT) ou de [<sup>3</sup>H]-cholestérol oléate (hydrolysable) (<sup>3</sup>H-EC). Cette méthode est plus précisément décrite par Roberts *et al.* (1985). Brièvement, 25 μCi de <sup>3</sup>H-ECT ou de <sup>3</sup>H-EC sont évaporés sous azote, puis suspendus à nouveau dans 250 μl d'acétone. La solution est ensuite mélangée à trois ml de sérum délipidé qui contient la CETP qui permet l'association des EC ou ECT marqués aux lipoprotéines. Les lipoprotéines à 1 mg/ml sont rajoutées par la suite à ce mélange, puis le tout est incubé pendant 30 minutes à 4°C. Les lipoprotéines sont

isolées à nouveau par ultracentrifugation. Les activités spécifiques des lipoprotéines marquées en EC sont de l'ordre de 10 000 cpm/ $\mu$ g protéine.

#### **2.4 Culture cellulaire**

Les cellules HepG2 sont cultivées dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> contenant 15 ml de Milieu Minimal Essentiel de Eagle (MEM) complété de 10% de *Fetalclone* (sérum bovin fœtal), pénicilline (100 unités/ml), streptomycine (100 mg/ml) et de glutamine (4 mM) comme décrit précédemment (Leblond *et al*, 1991). Le milieu de culture est changé tous les deux à trois jours. Les cellules sont décollées à la trypsine 0,25% pendant 5 minutes à 37°C, culotées, comptées et mises en culture une fois par semaine. La culture se fait en atmosphère saturée en eau et avec 5% de CO<sub>2</sub>, à 37°C.

#### **2.5 Sélection de lignées cellulaires transfectées de façon stable**

Les cellules HepG2 sont co-transfectées avec les plasmides pCMV-SPORT6, contenant l'ADNc de la L-FABP (distribué par ATCC<sup>®</sup>) ou par pCMV5 (vecteur vide), et pSV2-Neo (Invitrogen<sup>®</sup>) qui procure aux cellules une résistance à la Généticine (Néomycine) ou G418. Les bactéries *E.coli* contenant déjà ces plasmides sont mises en culture pour la nuit dans un milieu L-Broth sélectif (ampicilline 100  $\mu$ g/ml). L'extraction et la purification des plasmides sont réalisées avec une trousse Maxiprep de Qiagen<sup>®</sup>. Dans des plats de culture de 6 puits à 70% de confluence en cellules HepG2 et en absence de sérum, la transfection est réalisée avec 1,8  $\mu$ g de pCMV-SPORT6 ou de pCMV5 et 0,2  $\mu$ g de pSV2-Néo pour 12  $\mu$ l d'agent de transfection GeneJuice (EMD Biosciences<sup>®</sup>). Les transfectants stables sont sélectionnés par l'ajout de G418 (500  $\mu$ g/ml) dans le milieu de culture. Après 5 semaines de culture, les clones résistants sont isolés avec des cylindres de clonage et mis séparément en culture en présence de G418 (500  $\mu$ g/ml). Les clones sont analysés par immunodétection afin de constater les niveaux d'expression de la L-FABP.

## 2.6 *Évaluation des taux d'expression protéique de SR-BI, L-FABP, rLDL et $\beta$ -actine*

Les protéines cellulaires sont extraites par solubilisation avec un tampon détergent hypertonique contenant du Triton X-100 à 1,4%, 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  et 125 mM de Tris-HCl à pH 8. (Yoshimura *et al.* 1987). Les protéines (50  $\mu\text{g}$ ) sont séparées par SDS-PAGE « Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis » à 12,5% et transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45  $\mu\text{m}$ ). Cette membrane est incubée pendant 12 heures à 4°C avec du TBS contenant 5% de lait. Par la suite, en fonction de la protéine recherchée, la membrane peut être incubée avec des anticorps anti-SR-BI humain (1:5 000) pendant 1 heure 30 minutes à 37°C, anti-L-FABP (1:2 500) pour la nuit à 4°C, anti-rLDL (1:500) pendant 1 heure 30 minutes à 37°C et anti- $\beta$ -actine (1:15 000) pendant 1 heure 30 minutes à la température pièce en présence de lait écrémé (5%). La révélation se fait par réaction de chimiluminescence grâce aux anticorps secondaires liés à la peroxydase du raifort « horseradish peroxydase » sur des films d'autoradiographie HYBLOT CL, DENVILLE Scientific Inc. (Metuchen, NJ, USA). Une mesure densitométrique effectuée grâce au logiciel Quantity One 1-D Analysis de la compagnie BioRad® permet de mesurer l'expression des protéines.

## 2.7 *Analyse par RT-PCR de l'expression des ARNm de L-FABP, SR-BI et GAPDH*

Les amorces pour PCR de la L-FABP humaine sont montées grâce au logiciel Oligo 5.1 à partir d'une séquence d'ADN obtenue de GenBank (GenBank M10050). La synthèse des amorces est faite par Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). L'extraction de l'ARN total des cellules se fait grâce au TriZol (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). Le premier brin d'ADN est réalisé grâce à la trousse RT Omniscript (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Un volume de 5  $\mu\text{l}$  des

produits obtenus est utilisé pour la réaction de PCR. Les amorces utilisées pour la L-FABP sont 5'-TGT CGG AAA TCG TGC AG-3' (sens) regroupant les nucléotides 155 à 172, et 5'-GAT TAT GTC GCC GTT GAG TT-3' (anti-sens), comprenant les nucléotides 350 à 370. Le produit final attendu a une taille de 215 paires de bases. En ce qui concerne les PCR de SR-BI et de la GAPDH, les amorces utilisées sont : Pour la GAPDH : 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GTA TTG-3' (sens) et 5'-GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC-3' (anti-sens). Pour SR-BI : 5'-ACA ACG ACA CCG TGT CCT TC-3' (sens) et 5'-GAA GCC TTC GTT GGG TGG GTA GA-3' (anti-sens). La réaction de PCR optimisée pour toutes les amorces comprend 28 cycles de dénaturation (94°C, 45 secondes), l'hybridation (57°C pendant 30 secondes) et l'élongation (72°C pendant 120 secondes). Une durée de 7 minutes pour l'extension finale est nécessaire et se fait à 72°C. Le produit de la PCR est analysé par migration sur gel d'agarose à 1,5%.

## ***2.8 Captation sélective des esters de cholestérol des LDL et des HDL***

Les cellules sont lavées et incubées pendant 3 heures en présence de 20 µg/ml de LDL ou HDL marquées à l'iode 125 ou en ECt « EC tritiés » dans 125 µl de MEM concentré 2 fois contenant 4% d'albumine sans acides gras, à 37°C durant 3 heures dans un volume total de 250 µl. L'association non spécifique est déterminée par ajout de LDL ou de HDL non marquées (1 mg/ml). En fin d'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec un tampon phosphate salin contenant 0,2% BSA « Bovine Serum Albumine » (TBS-BSA 0,2%). Les cellules sont solubilisées dans 1,5 ml de NaOH (0,1 M), et leur radioactivité est mesurée grâce à un compteur gamma si le marquage a été fait avec de l' $^{125}\text{I}$  ou au compteur bêta si le tritium a été utilisé pour le marquage. L'association des lipoprotéines iodées est exprimée en µg de protéines par milligramme de protéines cellulaires. Il en est de même pour celles qui ont été tritiées. L'association spécifique est obtenue par soustraction de l'association non spécifique à l'association totale. La soustraction de l'association des lipoprotéines

iodées des EC-lipoprotéines tritiées est réalisée. Si ce résultat est supérieur à 1, cela indique de la captation sélective.

### **2.9 Hydrolyse des esters de cholestérol**

Afin de déterminer les niveaux d'hydrolyse des esters de cholestérol des LDL ou des HDL et les voies d'hydrolyse empruntées, des  $^3\text{H}$ -EC-LDL ou des  $^3\text{H}$ -EC-HDL ont été incubés à 37°C pendant 3 heures après une heure de traitement avec ou sans 100  $\mu\text{M}$  de chloroquine. Les cellules sont mises sur glace, lavées deux fois au PBS-BSA à 0,2% puis une fois au PBS « Tampon Phosphate Salin », puis une délipidation est réalisée par ajout de deux fois 1 ml d'hexane-isopropanol (3:2 v/v). Les extraits sont évaporés sous azote et resuspendus dans 100  $\mu\text{l}$  de chloroforme, appliqués sur une plaque de chromatographie en couche mince en gel de silice. La phase mobile est constituée d'éther de pétrole, d'éther anhydre et d'acide acétique (90:10:1 v/v/v). Les zones correspondant au cholestérol libre et estérifié sont révélées par vapeur d'iode, séparées de la plaque par grattage puis leur radioactivité est mesurée au compteur *bêta*.

### **2.10 ARN interférence**

Les deux duplexes de siRNA ayant pour cible la L-FABP ont été construits et distribués par Qiagen (Mississauga, Ontario, Canada). Le duplexe Hs\_FABP1\_2\_HP siRNA a pour séquence sens r(AGU CUG UGA CCG AAC UCA A)dTdT, et pour antisens r(UUG AGU UCG GUC ACA GAC U)dTdG. Le duplexe Hs\_FABP1\_3\_HP siRNA a pour séquence sens r(AGU UGG AAG GUG ACA AUA A)dTdT, et pour antisens r(UUA UUG UCA CCU UCC AAC U)dGdA. Après resuspension dans du tampon de suspension siRNA (Qiagen), pour chaque séquence, les deux oligonucléotides sont mélangés dans un rapport 1:1, puis hybridés à 95°C pendant une minute puis laissés jusqu'à un retour à la température ambiante. Le duplexe est complexé avec l'agent de transfection ESCORT V (Sigma) à raison de 3, 6 ou 12  $\mu\text{l}$

d'ESCORT V par  $\mu\text{g}$  de duplexe. Un contrôle négatif fourni par Qiagen est aussi utilisé pour vérifier l'impact de la transfection seule sur l'expression de la L-FABP. La transfection est réalisée une fois par jour pendant 48 ou 72 heures. Les cellules sont ensuite analysées par immunodétection afin de constater les niveaux d'expression de L-FABP.

### ***2.11 Stimulation de la L-FABP par des agonistes des PPAR $\alpha$***

Afin d'augmenter la masse protéique de L-FABP dans des cellules HepG2, des agonistes des PPAR $\alpha$  sont mis en contact avec ces cellules à 50% de confluence, 24 heures après leur mise en culture. Ainsi, 0,5; 1 et 2 mM de Bezafibrate (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada.) ou 0,15; 0,33 et 0,60 mM de WY14.643 (Sigma) préalablement dissous dans du DMSO « Diméthyl Sulfoxyde » sont ajoutés à ces cellules pendant 72 heures (La concentration finale de DMSO est toujours inférieure ou égale à 1%). Par la suite, les niveaux de L-FABP sont estimés par immunobuvargage (Wolfrum *et al.* 1999).

### ***2.12 Analyse statistique***

En ce qui concerne l'analyse statistique, les moyennes et les erreurs types ont été calculées pour les données de chaque expérience. Les valeurs ont fait l'objet de comparaisons grâce au logiciel Graph Pad Prism 5.0 par un test de t de Student. Une différence statistique entre deux valeurs est effective avec un p inférieur à 5% ( $p < 0.05$ ).

### ***2.13 Autres méthodes utilisées***

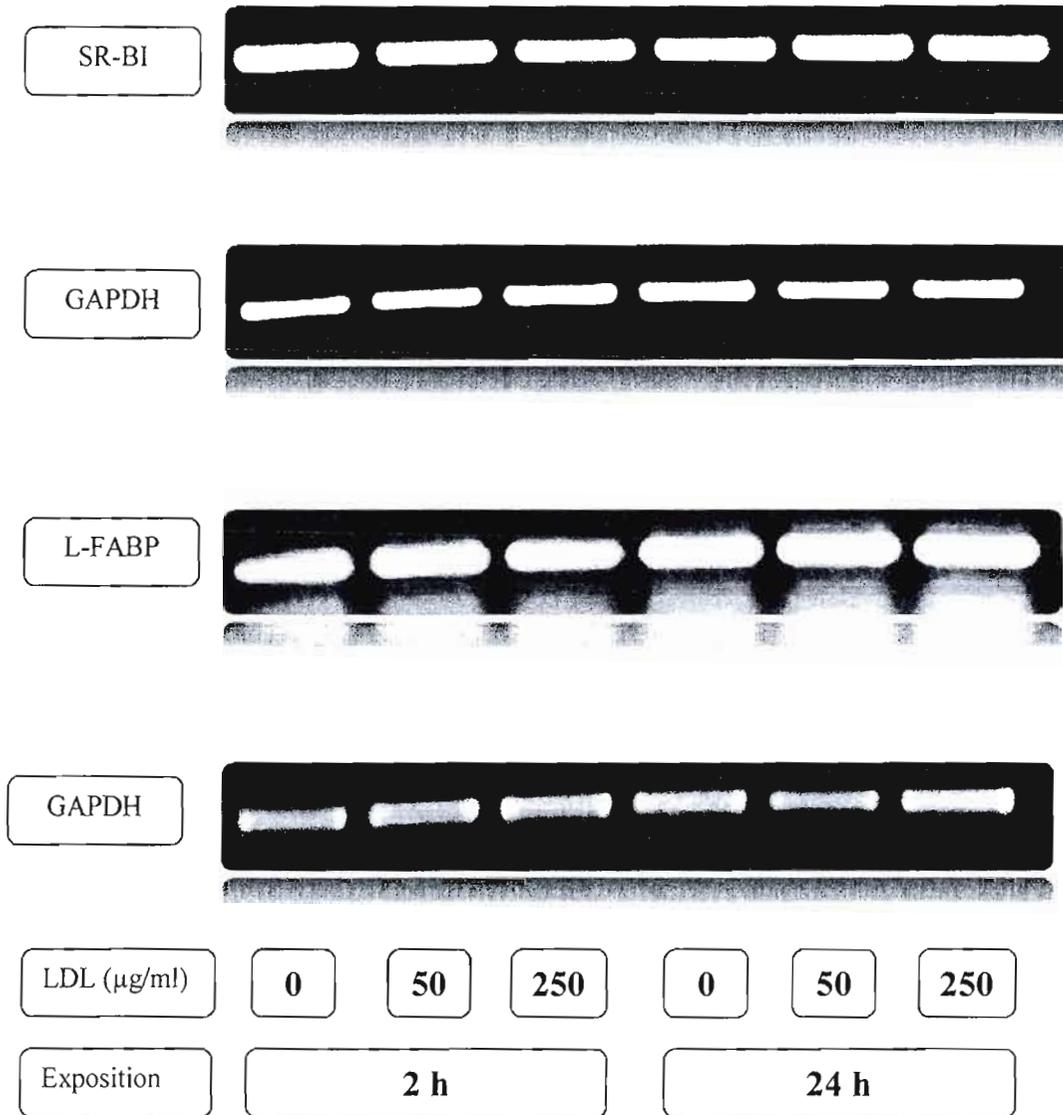
Tous les dosages protéiques ont été réalisés selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.* 1951).

### 3 RESULTATS

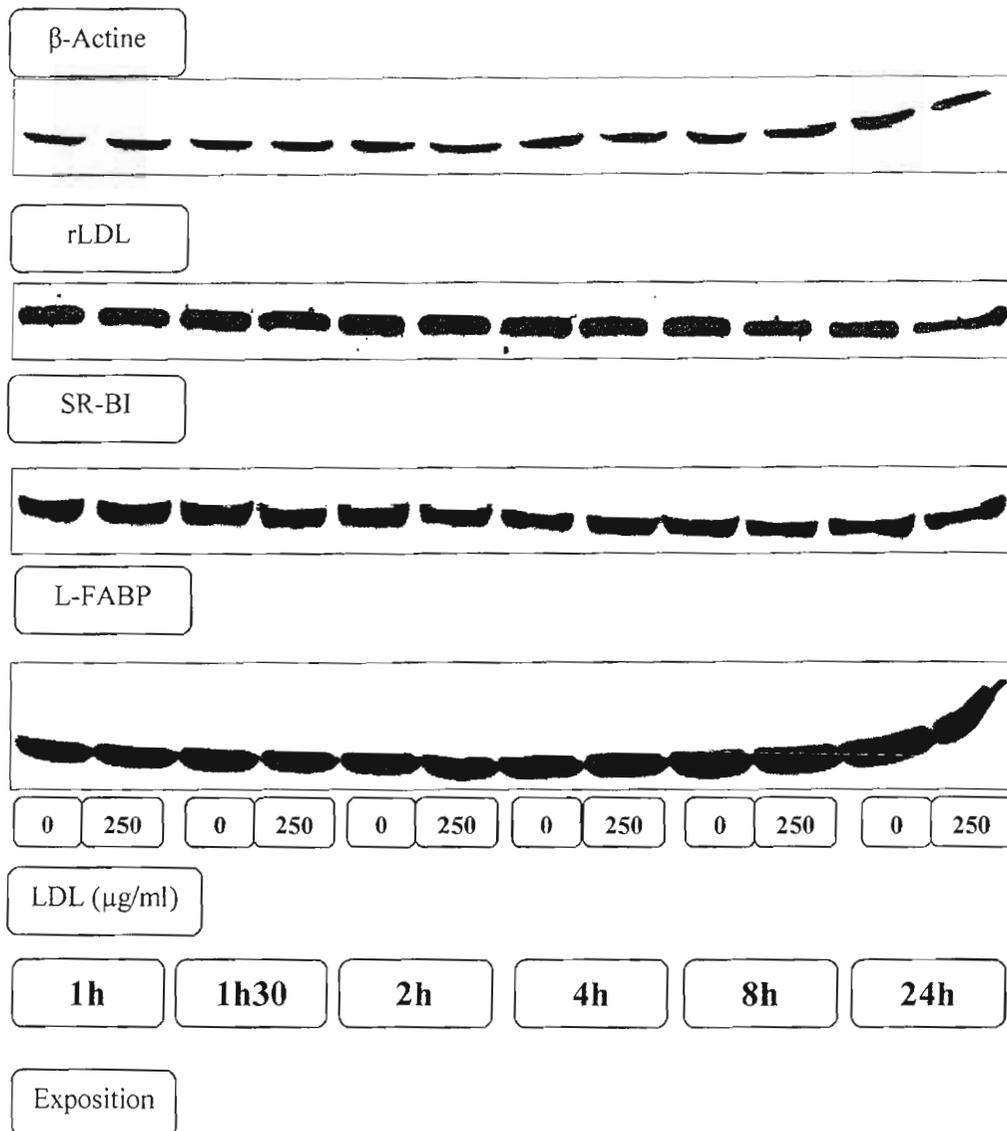
#### 3.1 *Impact des LDL sur les principaux acteurs de la captation de leurs esters de cholestérol.*

Dans le but de définir si les niveaux élevés de L-FABP retrouvés dans les cellules surexprimant le SR-BI (Rhains *et al.* 2004), notamment chez le clone S1.7, sont dus aux acides gras dérivés des esters de cholestérol provenant de l'activité de SR-BI ou à un autre facteur, des cellules HepG2 ont été exposées à différentes concentrations de LDL durant des périodes de 2 et 24 heures. Par la suite, les ARNm extraits ont été soumis à l'action de la transcriptase inverse. Une réaction de polymérase en chaîne a ensuite été effectuée afin de visualiser une éventuelle modulation des taux d'ARNm de SR-BI et de la L-FABP suite à ces traitements. Les résultats présentés à la figure 1 révèlent que les quantités de LDL (50 et 250 ug/ml) mises en contact avec les cellules n'ont provoqué aucune variation des taux d'ARNm de SR-BI et de la L-FABP. Le contrôle au niveau de la GAPDH permet de constater que la même quantité de produit de PCR a été chargée pour chaque échantillon.

La possibilité d'une activation post transcriptionnelle pouvant néanmoins être envisagée, des expériences de quantification des niveaux protéiques de la L-FABP et du SR-BI ont été réalisées par immunobavardage (Fig.2). Sachant que le rLDL est avec le SR-BI le principal récepteur prenant en charge les LDL et que son activité et sa présence sont régulées à la hausse par un sevrage en lipoprotéines et à la baisse par la présence, dans la cellule, de CL ou de CE (Srivastava *et al.* 1995), le niveau d'expression du rLDL a aussi été évalué (Fig.2). Préalablement à l'extraction des protéines cellulaires totales, le traitement des cellules HepG2, avec 0 et 250 µg de



**Figure 1:** RT-PCR des ARNm de SR-BI et de la L-FABP après une exposition de cellules HepG2 à des LDL. Les cellules HepG2 dans des plats de culture de 60 mm ont été incubées avec à 0, 50 et 250  $\mu\text{g}$  de LDL/ml de milieu pendant 2 ou 24 heures à 37°C. Après une réaction de transcriptase inverse, les produits de réaction ont été soumis à une PCR avec les amorces et les cycles spécifiques aux ARNm recherchés. Cinq  $\mu\text{l}$  de ces produits de PCR ont été chargés sur un gel d'agarose à 2,5%. Les niveaux d'ARNm de la GAPDH ont été évalués à titre de contrôle expérimental. Les 4 essais réalisés ont présenté des résultats identiques.



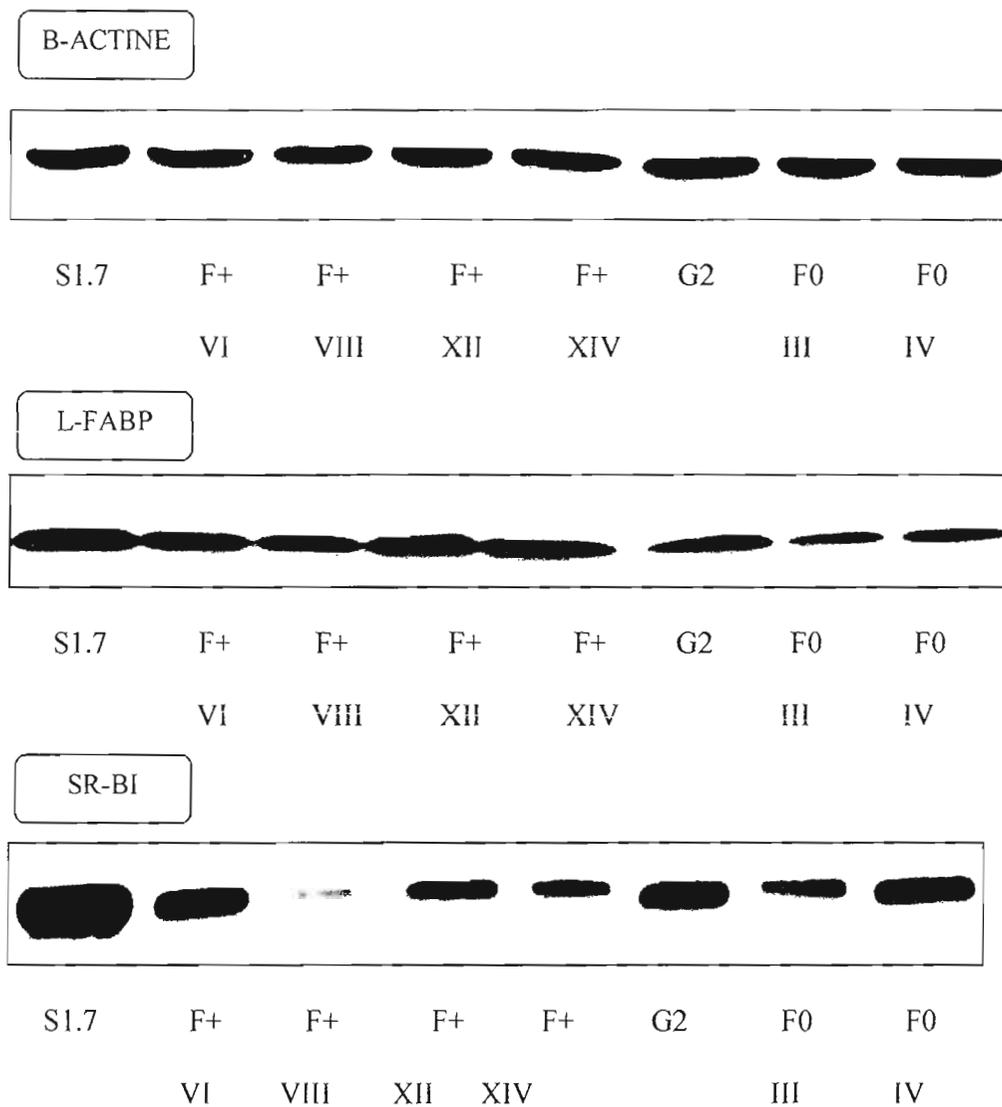
**Figure 2 :** Niveaux protéiques des rLDL, SR-BI et L-FABP après une exposition de cellules HepG2 à des LDL. Les cellules dans des plats de culture de 35 mm ont été incubées avec 0 et 250  $\mu$ g de LDL/ml de milieu pendant 1, 1.5, 2, 4, 8 heures à 37°C. Après une extraction protéique, 50  $\mu$ g de protéines de chaque extrait cellulaire ont été soumis à un SDS-PAGE, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les anticorps dirigés contre les protéines cibles ont été appliqués préalablement à une révélation par chimiluminescence. Les niveaux de  $\beta$ -Actine ont été évalués à titre de contrôle expérimental. Les 4 essais réalisés ont présenté des résultats identiques.

protéines par ml de LDL, a été appliqué sur une période s'étendant de 0 à 24 heures. Le contrôle du niveau de la  $\beta$ -Actine permet de constater que la même masse de protéines a été chargée pour les immunobuvardages. En ce qui a trait aux protéines ciblées par ces expériences, il apparaît qu'aucun récepteur étudié ne démontre de variations au niveau de son taux d'expression suite aux traitements.

Il est aussi possible de remarquer qu'un sevrage en lipides, même après 24 heures n'a eu aucun impact sur les taux des protéines observées. Des temps d'exposition entre 0 et 1 heure ont aussi été testés, mais ils ont aussi suivi cette tendance. Ainsi, l'hypothèse d'une activation post transcriptionnelle de la L-FABP n'a pu être révélée par les traitements effectués. Suite à ces expériences, il est possible de dire, qu'une exposition des cellules HepG2 à 250  $\mu$ g de protéines par ml de LDL n'affecte pas l'expression du gène de SR-BI, et que l'augmentation de la L-FABP retrouvée chez les cellules surexprimant SR-BI n'est due, ni à une entrée des EC des LDL amenés par SR-BI, ni aux acides gras issus de leur dégradation.

### **3.2 Surexpression de la L-FABP dans des hépatocarcinomes humains HepG2**

Certaines des études effectuées sur les potentiels ligands de la L-FABP ont évoqué la capacité de cette protéine à lier le cholestérol (Bass *et al.* 1985 ; Vincent et Muller-Eberhard, 1985). Nous avons donc voulu tester l'hypothèse qu'une augmentation du niveau d'expression de la L-FABP par une approche biotechnologique pouvait mener à une augmentation de la capacité des cellules HepG2 à capter le cholestérol associé aux lipoprotéines. Ainsi, une série de cellules HepG2 a été co-transfectée avec un vecteur contenant l'ADNc de la L-FABP (F+) et pSV2-Néo, d'une part, et ce même vecteur vide (F0) et pSV2-Néo d'autre part. Il a fallu plusieurs amplifications des vecteurs avec différents protocoles de Maxiprep afin d'obtenir la pureté nécessaire à la transfection. C'est pourquoi quatre essais de transfection ont été nécessaires. Suite à des mises au point s'étalant sur plusieurs mois et à des semaines supplémentaires de



**Figure 3 :** Niveaux protéiques de SR-BI et de la L-FABP après transfection de cellules HepG2 avec l'ADNc codant pour la L-FABP. Après une extraction protéique, 50 µg de protéines de chaque extrait cellulaire ont été soumis à un SDS-PAGE, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les anticorps dirigés contre les protéines cibles ont été appliqués préalablement à une révélation par chimiluminescence. F+ étant utilisé pour désigner un clone surexprimant de la L-FABP, F0 pour un clone contrôle, S1.7 pour un clone surexprimant de SR-BI et G2 pour des cellules HepG2. Les 3 essais réalisés ont présenté des résultats identiques.

sélection, trente clones ont été prélevés, mis en culture et testés par immunobuvardage dirigé contre la L-FABP et ce, pour les cellules devant théoriquement surexprimer la L-FABP (F+) et les cellules contrôles (F0). Au final, quatre clones surexprimant la L-FABP et deux clones contrôles ont été choisis en fonction de leur taux d'expression de la L-FABP. Les immunobuvardages réalisés sur les clones obtenus ont permis de visualiser l'expression de la L-FABP et du SR-BI. Le clone S1.7 qui, par défaut surexprime L-FABP, a été inclus dans ces expériences à titre de comparatif.

Différents taux d'expression de la L-FABP sont observables chez les clones obtenus après sélection (Fig. 3). Le contrôle de la  $\beta$ -actine fait remarquer que la même masse de protéine a été utilisée pour chaque clone testé. Tel que rapportée par notre équipe (Rhains *et al.* 2004), une forte expression de la L-FABP est observable chez le clone S1.7. Dans ce cas précis (Tableau I), ce clone exprime 238% plus que la souche sauvage HepG2. Les clones F+12 et F+14 surexpriment aussi la L-FABP, en l'occurrence, respectivement, 210 et 173% plus que les cellules HepG2. Les contrôles F0.3 et F0.4, quant à eux présentent des niveaux d'expression de l'ordre de 64 et 82%, qui s'avèrent être plus proches de ceux de la souche sauvage. Notre technique de détection permet de constater une plus forte expression de SR-BI de l'ordre de 220% chez le clone S1.7, en accord avec nos attentes (Rhains *et al.* 2004). Toutefois nous avons été surpris par l'augmentation observée dans les clones F+6 et F0.4 (Tableau I). En effet, ils montrent des niveaux d'expression respectifs de 121 et 136% supérieurs à celui de la cellule HepG2. Aussi, F+8 et F+14 sont les clones les plus pauvres en SR-BI car ils expriment 37 et 46% des niveaux de la souche sauvage. Enfin, on retrouve les clones F+12 et F0.3 avec 71 et 76% du niveau de SR-BI retrouvé chez les cellules HepG2. C'est le clone F0.4, qui présente des profils protéiques plus proches de ceux de la cellule HepG2, qui sera considéré comme contrôle pour les expériences suivantes.

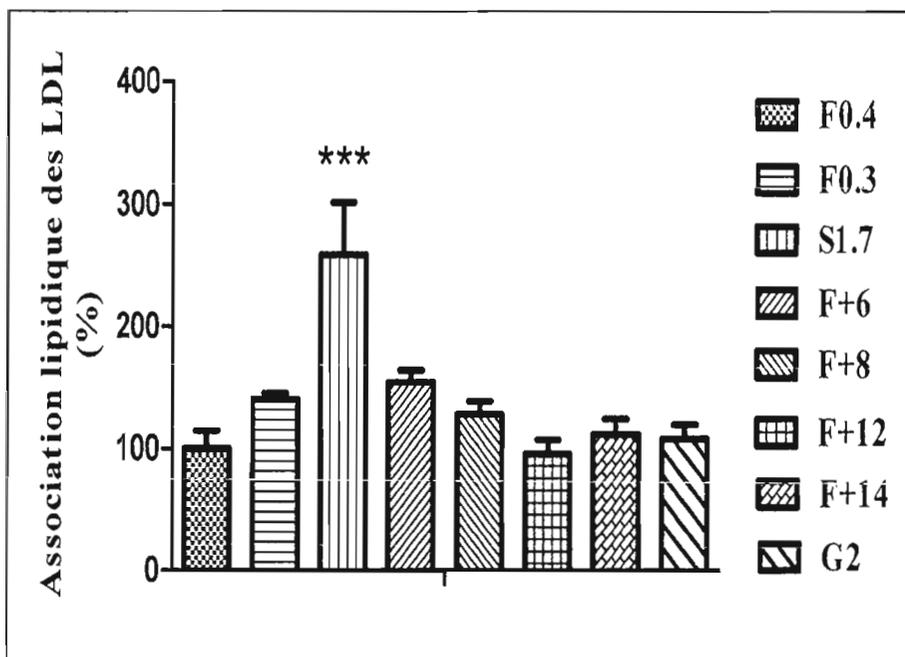
**Tableau III :** Taux d'expression de la L-FABP et de SR-BI après la transfection de cellules HepG2 avec l'ADNc codant pour la L-FABP. Après une extraction protéique, 50 µg de protéines de chaque extrait cellulaire ont été soumis à un SDS-PAGE, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les anticorps dirigés contre les protéines cibles ont été appliqués préalablement à une révélation par chimiluminescence. Un minimum de deux prises de données chiffrées a été réalisé par densitométrie pour chacun des clones.

Clone	L-FABP		SR-BI	
	Expression moyenne (%)	Erreur – Type Moyenne	Expression moyenne (%)	Erreur – Type Moyenne
<b>G2</b>	100	-	100	-
<b>S1.7</b>	238,4	21,8	219,6	8,2
<b>F+6</b>	148,3	8,4	121,1	0,2
<b>F+8</b>	122,6	15,8	37,3	21,6
<b>F+12</b>	210,2	28,6	70,9	0,8
<b>F+14</b>	173,5	26,3	45,4	9,6
<b>F0.3</b>	63,9	6,2	75,9	12,8
<b>F0.4</b>	82,4	12,3	135,9	7

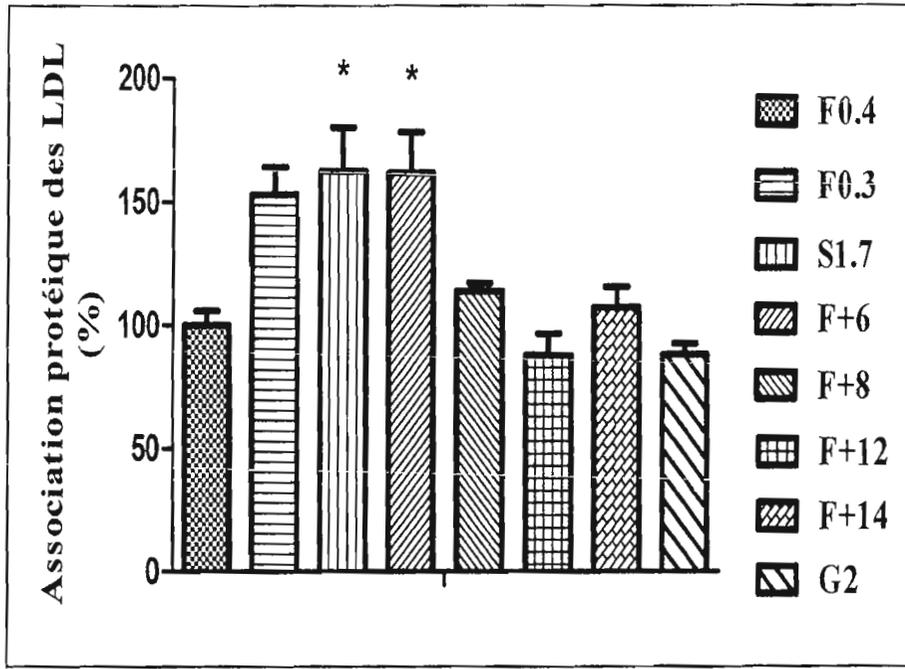
### *3.3 Impact de la L-FABP sur la captation sélective des esters de cholestérol provenant des LDL*

Pour déterminer l'importance d'un éventuel impact de la L-FABP sur la captation sélective des EC des LDL, des expériences d'association ont été réalisées avec des cellules HepG2 exprimant différents niveaux de L-FABP. L'étendue de la variation de l'expression de la protéine ciblée au sein du groupe de cellules testées permettait de savoir si une corrélation pouvait être établie entre la L-FABP et l'association lipidique des LDL chez les cellules HepG2. La figure 4 montre que le type S1.7 permet une association lipidique supérieure à celle du type sauvage (G2) et du type F0.4, que l'on considère comme contrôles, de 140 et 160% respectivement. Cependant, il est à noter que les autres cellules surexprimant la L-FABP (F+) ne présentent pas de variation significativement différente de l'association lipidique. En effet, pour les cellules exprimant le plus cette protéine (F+12 et F+14), des valeurs d'association lipidique du même ordre que celles du contrôle et du type sauvage sont observées. Cela indique donc qu'il n'y aurait pas de lien direct entre l'expression de la L-FABP et l'association lipidique des LDL.

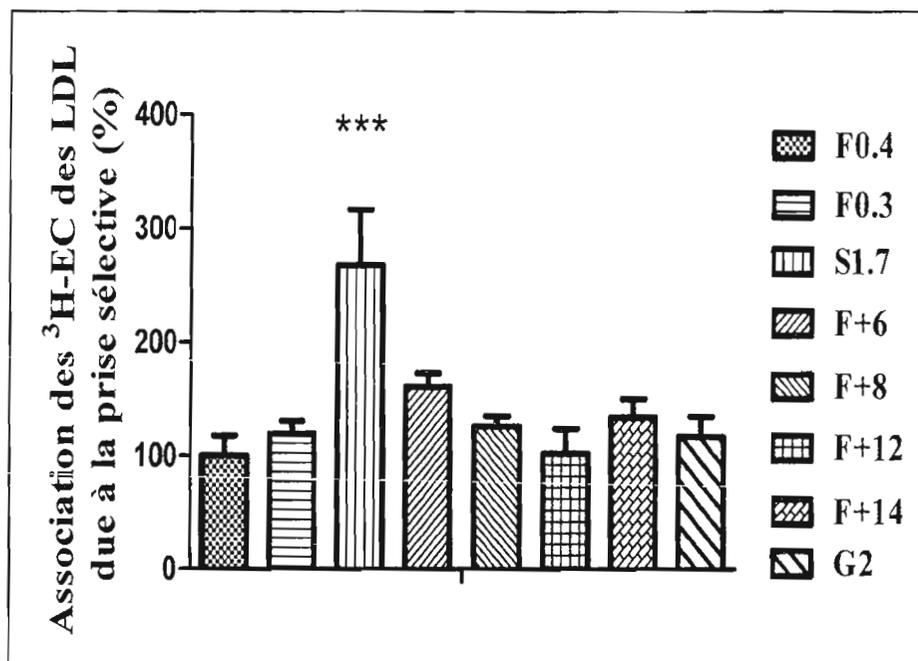
Le lien entre l'association protéique des LDL (Fig. 5) et l'expression de la L-FABP a été aussi recherché par le biais d'essais d'association sur les mêmes cellules. Ainsi, uniquement les types S1.7 et F+6 diffèrent significativement du contrôle F0.4. En effet, ils présentent une association protéique représentant respectivement 62 et 61% plus que la valeur obtenue avec le contrôle F0.4. Cependant, si l'on compare à la valeur obtenue avec la cellule HepG2, à part S1.7 et F+6 qui se démarquent de la même manière, on observe aussi que le clone F0.3 montre une association protéique significativement supérieure. Il est toutefois important de noter que les clones F+12 et F+14, qui expriment fortement la L-FABP, présentent une association protéique significativement inférieure à celle des clones S1.7 et F+6. Cependant, ces valeurs d'association demeurent proches de celles du contrôle F0.4 et de la cellule HepG2.



**Figure 4 :** Association lipidique des LDL avec des cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux. Les cellules dans des plats de culture de 12 puits ont été incubées avec 20 µg de LDL marquées au niveau lipidique avec du  $^3\text{H-EC}$  par ml de milieu pendant 4 heures à 37°C. En ajoutant des lipoprotéines non marquées (1,5 mg de protéines par ml), l'association non spécifique est déterminée. La soustraction de cette dernière à l'association totale fournit ainsi l'association lipidique spécifique des EC des LDL. Les valeurs des cellules contrôles (F0.4) ont été ajustées à 100%. Toutes les valeurs exposées ci-dessus sont exprimées en moyennes  $\pm$  S.E.M, N= 5. F+ désigne un clone surexprimant la L-FABP, F0 un clone contrôle, S1.7 un clone surexprimant SR-BI et G2 les cellules HepG2. (\*) indique une différence significative par rapport au contrôle: \*\*\*  $\rho < 0,0001$ .



**Figure 5 :** Association protéique des LDL avec des cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux. Les cellules dans des plats de culture de 12 puits ont été incubées avec 20  $\mu\text{g}$  de LDL marquées à l'iode-125 par ml de milieu pendant 4 heures à 37°C. En ajoutant des lipoprotéines non marquées (1,5 mg de protéines par ml), l'association non spécifique est déterminée. La soustraction de cette dernière à l'association totale fournit ainsi l'association protéique spécifique. Les valeurs des cellules contrôle (F0.4) ont été ajustées à 100%. Toutes les valeurs exposées ci-dessus sont exprimées en moyennes  $\pm$  S.E.M. N=6. F+ désigne un clone surexprimant la L-FABP, F0 un clone contrôle, S1.7 un clone surexprimant SR-BI et G2 les cellules HepG2. (\*) indique une différence significative par rapport au contrôle:  $*p < 0,05$ .



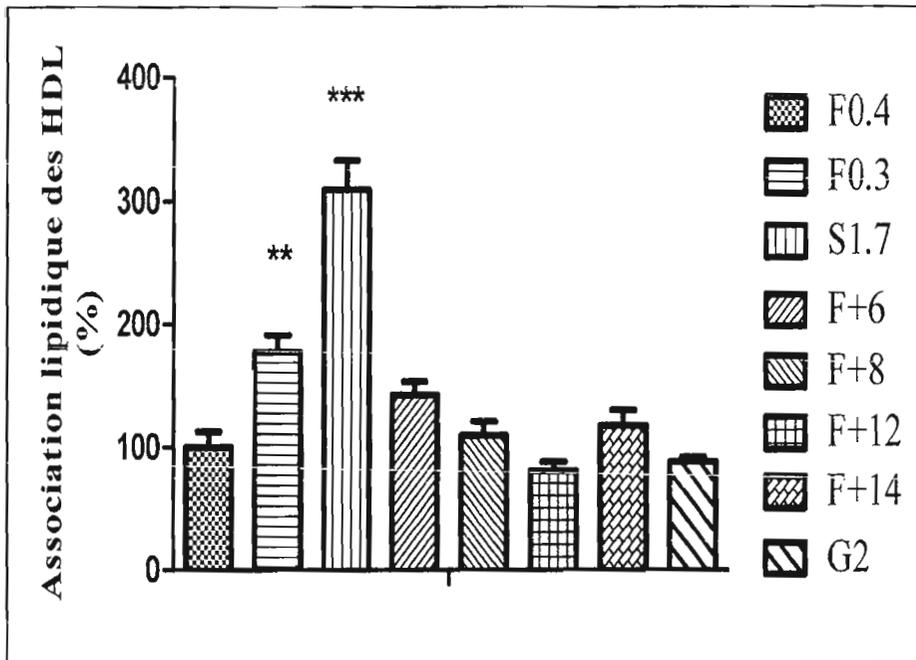
**Figure 6 :** Association des <sup>3</sup>H-EC provenant des LDL causée par la captation sélective chez des HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux. Les cellules dans des plats de culture de 12 puits ont été incubées avec 20 µg de LDL marquées par ml de milieu pendant 4 heures à 37°C. En ajoutant des lipoprotéines non marquées (1,5 mg de protéines par ml), l'association non spécifique est déterminée. La soustraction de cette dernière à l'association totale fournit ainsi l'association spécifique. Pour déterminer l'association spécifique des EC des LDL due à la captation sélective, l'association protéique est retranchée de l'association lipidique (rapportés en µg par mg de protéines). Les valeurs des cellules contrôle (F0.4) ont été ajustées à 100%. Toutes les valeurs exposées ci-dessus sont exprimées en moyennes ± S.E.M. N=5. F+ désigne un clone surexprimant la L-FABP, F0 un clone contrôle, S1.7 un clone surexprimant SR-BI et G2 les cellules HepG2. (\*) indique une différence significative par rapport au contrôle: \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Aussi, on peut déduire que la L-FABP ne contribue pas à l'association protéique des LDL. Finalement, les expériences d'association ont permis de quantifier l'impact de l'expression de la L-FABP sur la captation sélective des EC des LDL par la cellule hépatique. Ainsi, la figure 6 permet de remarquer premièrement, que le type S1.7 capte respectivement 167 et 128% plus d'EC des LDL que le contrôle F0.4 et que la cellule HepG2. Deuxièmement, les autres types cellulaires surexprimant la L-FABP sont tous significativement différents de S1.7 mais pas du contrôle F0.4, ni de la cellule HepG2. Ces résultats stipulent donc que la L-FABP ne contribue pas à la captation sélective des EC des LDL.

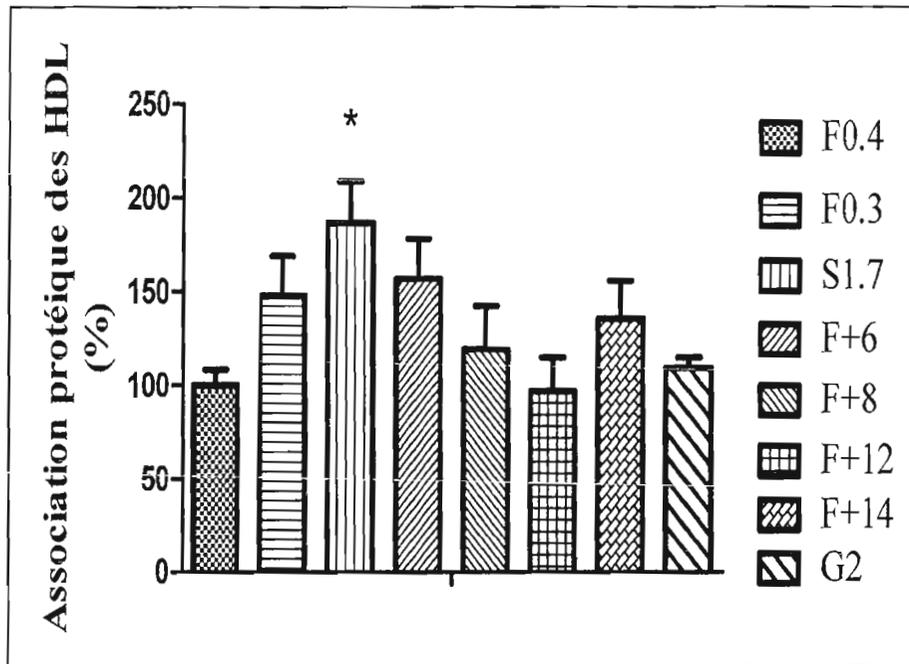
### ***3.4 Impact de la L-FABP sur la captation sélective des esters de cholestérol provenant des HDL***

Des expériences d'association ont aussi été réalisées avec des HDL. Le but étant de vérifier si la L-FABP contribue à la captation des EC de ces particules.

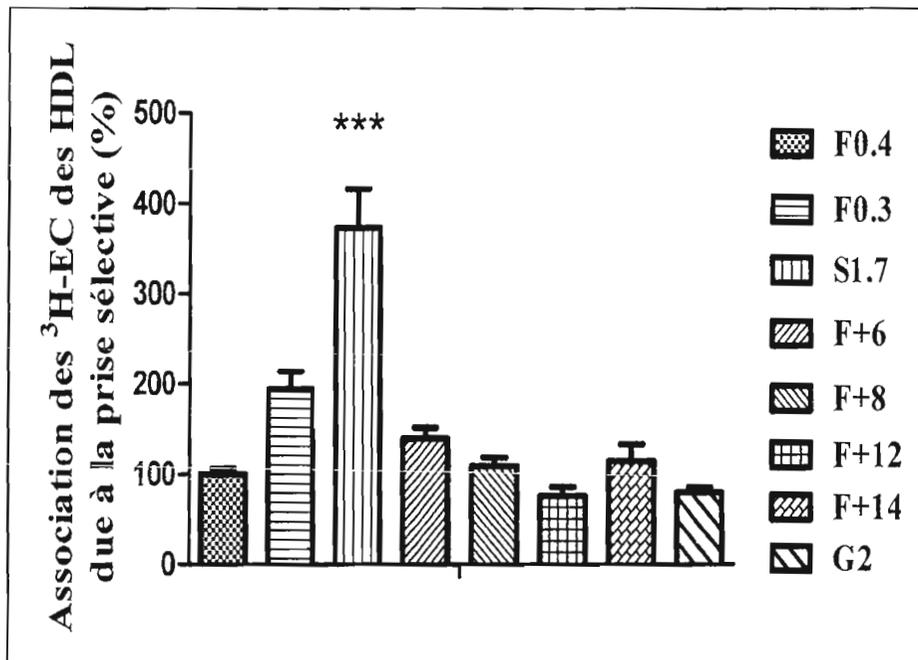
En ce qui concerne l'association lipidique, la figure 7 fait remarquer 3,1 fois plus d'association chez le clone S1.7 par rapport au contrôle F0.4. Néanmoins, un des clones générés par une transfection avec un vecteur vide (F0.3) montre une valeur supérieure de 60% à celle du contrôle. Comme pour les LDL, les cellules surexprimant la L-FABP ne font pas varier significativement l'association lipidique des HDL. En effet, les valeurs exprimées se rapprochent de celles du contrôle F0.4 et de la cellule HepG2. La L-FABP n'influence donc pas l'association lipidique des HDL.



**Figure 7:** Association lipidique des HDL avec des cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux. Les cellules dans des plats de culture de 12 puits ont été incubées avec 20  $\mu\text{g}$  de HDL marquées au niveau lipidique avec du  $^3\text{H-ECt}$  par ml de milieu pendant 4 heures à 37°C. En ajoutant des lipoprotéines non marquées (1,5 mg de protéines par ml), l'association non spécifique est déterminée. La soustraction de cette dernière à l'association totale fournit ainsi l'association lipidique spécifique des EC des HDL. Les valeurs des cellules contrôle (F0.4) ont été ajustées à 100%. Toutes les valeurs exposées ci-dessus sont exprimées en moyennes  $\pm$  S.E.M. N=5. F+ désigne un clone surexprimant la L-FABP, F0 un clone contrôle, S1.7 un clone surexprimant SR-BI et G2 les cellules HepG2. (\*) indique une différence significative par rapport au contrôle: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .



**Figure 8 :** Association protéique des HDL avec des cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux. Les cellules dans des plats de culture de 12 puits ont été incubées avec 20  $\mu\text{g}$  de HDL marquées à l'iode 125 par ml de milieu pendant 4 heures à 37°C. En ajoutant des lipoprotéines non marquées (1,5 mg de protéines par ml), l'association non spécifique est déterminée. La soustraction de cette dernière à l'association totale fournit ainsi l'association protéique spécifique des HDL. Les valeurs des cellules contrôle (F0.4) ont été ajustées à 100%. Toutes les valeurs exposées ci-dessus sont exprimées en moyennes  $\pm$  S.E.M. N=5. F+ désigne un clone surexprimant la L-FABP, F0 un clone contrôle, S1.7 un clone surexprimant SR-BI et G2 les cellules HepG2. (\*) indique une différence significative par rapport au contrôle:  $*p < 0,05$ .



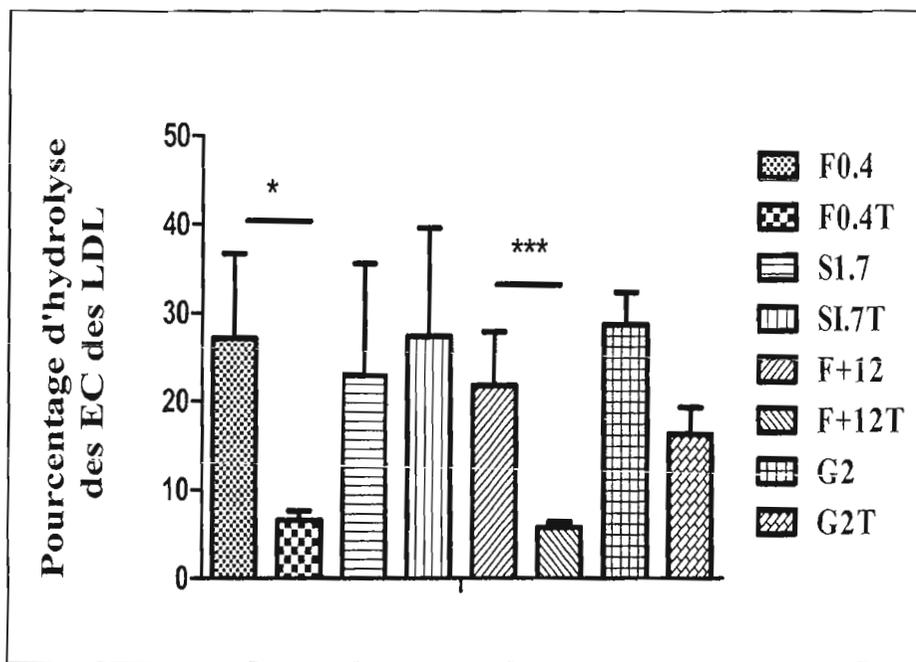
**Figure 9** : Association des <sup>3</sup>H-EC provenant des HDL causée par la captation sélective chez des HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux. Les cellules dans des plats de culture de 12 puits ont été incubées avec 20 µg de HDL marquées par ml de milieu pendant 4 heures à 37°C. En ajoutant des lipoprotéines non marquées (1,5 mg de protéines par ml), l'association non spécifique est déterminée. La soustraction de cette dernière à l'association totale fournit ainsi l'association spécifique. Pour déterminer l'association spécifique des EC des HDL due à la captation sélective, l'association protéique est retranchée de l'association lipidique (rapportés en µg par mg de protéines). Les valeurs des cellules contrôle (F0.4) ont été ajustées à 100%. Toutes les valeurs exposées ci-dessus sont exprimées en moyennes ± S.E.M. N=5. F+ désigne un clone surexprimant la L-FABP, F0 un clone contrôle, S1.7 un clone surexprimant SR-BI et G2 les cellules HepG2. (\*) indique une différence significative par rapport au contrôle: \*\*\*  $p < 0,0001$ .

L'expérience d'association protéique, représentée sur la figure 8, met en évidence la capacité du clone S1.7 à lier significativement plus de HDL que le contrôle F0.4. Plus exactement, 189% de HDL se sont associées à ce type de cellules. Les clones surexprimant la L-FABP ne se sont pas distingués au cours de cette expérience en ne présentant pas de valeurs d'association protéique différentes de celles du contrôle F0.4 et de la cellule HepG2. L'influence de la L-FABP sur l'association protéique des HDL paraît être inexistante.

L'impact de la L-FABP sur la captation sélective des EC provenant des HDL a pu être vérifié par le biais des expériences d'association menées précédemment. Sur la figure 9, il apparaît que seul le type S1.7 a la capacité de capter sélectivement plus d'EC des HDL que les cellules contrôles F0.4. Les cellules qui surexpriment la L-FABP présentent, quant à elles, des taux de captation sélective similaires à ceux du contrôle et de la cellule HepG2. À la lumière des expériences d'association, que le substrat provienne des LDL ou des HDL, il est clair que la L-FABP n'affecte aucunement la captation des esters de cholestérol par les hépatocarcinomes humains.

### ***3.5 Contribution de la L-FABP à l'hydrolyse des esters de cholestérol des LDL et HDL***

Notre groupe (Rhainds *et al.* 2004) ayant démontré grâce à des traitements des cellules avec de la chloroquine que les EC provenant des LDL par le processus de captation sélective étant majoritairement hydrolysés dans un compartiment lysosomal, alors que ceux des HDL ne le sont qu'à 50%, nous avons également voulu mettre à jour une éventuelle intervention de la L-FABP dans le processus de prise en charge des EC des lipoprotéines par la cellule hépatique. Pour ceci des expériences d'hydrolyse d'EC ont été menées sur des HepG2 exprimant cette protéine à différents niveaux. De plus, en présence ou en absence d'un traitement à la



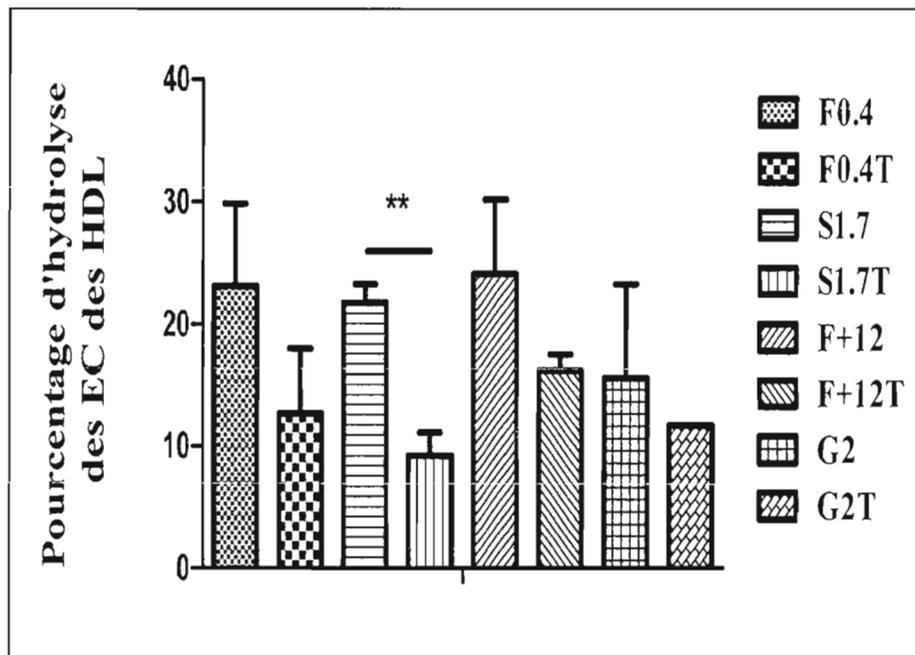
**Figure 10 :** Efficacité d'hydrolyse des esters de cholestérol des LDL par des cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux. Les cellules dans des plats de culture de 12 puits ont été prétraitées (T) ou pas avec 100  $\mu$ M de chloroquine pendant 1h, puis ont été incubées avec, 20  $\mu$ g de LDL marquées au niveau lipidique avec du  $^3$ H-EC, par ml de milieu pendant 4 heures à 37°C. En ajoutant des lipoprotéines non marquées (1,5 mg de protéines par ml), l'association non spécifique est déterminée. La soustraction de cette dernière à l'association totale fournit ainsi l'association lipidique spécifique des EC des LDL. Les lipides ont été extraits, séparés par chromatographie sur couche mince. La radioactivité incorporée dans les EC et le CL a été mesurée et le pourcentage d'hydrolyse calculé. Toutes les valeurs exposées ci-dessus sont exprimées en moyennes  $\pm$  S.E.M. N=2. F+ désigne un clone surexprimant la L-FABP, F0 un clone contrôle, S1.7 un clone surexprimant SR-BI, G2 les cellules HepG2 et T un traitement à la chloroquine. (\*) indique une différence significative par rapport à l'absence de traitement: \* $\rho < 0,05$ ; \*\*\*  $\rho < 0,0001$

chloroquine, il devenait possible de déduire si la L-FABP favorise une hydrolyse intra ou extralysosomale. Ainsi, 20 µg/ml de LDL ou de HDL marquées avec des <sup>3</sup>H-EC ont été incubés avec des hépatocarcinomes humains surexprimant L-FABP, un clone contrôle, et la cellule HepG2 pendant 4 heures à 37°C, en présence ou absence de chloroquine. Tel que le démontre la figure 10, les taux d'hydrolyse des <sup>3</sup>H-EC associés aux LDL, sont respectivement de l'ordre de 27% et 29% pour le contrôle F0.4 et la cellule HepG2.

Aucune variation significative des taux d'hydrolyse des EC des LDL n'a été remarquée indépendamment des niveaux l'expression de la L-FABP. Ainsi, cette protéine n'interviendrait pas au niveau de capacité de la cellule à hydrolyser les EC-LDL. L'emploi de 100 mM d'un agent lysosomotrope comme la chloroquine a mené à une réduction de l'hydrolyse des <sup>3</sup>H-EC des LDL. En effet, chez les clones F0.4, F+12 et la cellule HepG2, l'hydrolyse a diminué de 75, 73 et 43%, respectivement. En revanche, l'impact de la chloroquine est nul sur le clone S1.7.

Avec les HDL (Fig. 11), des valeurs similaires d'efficacité d'hydrolyse sont relevées en absence de traitement. L'expression de la L-FABP n'affecte en rien l'hydrolyse des EC des HDL. Cependant, le traitement à la chloroquine provoque aussi une tendance à la diminution de l'hydrolyse. Les variations négatives observables sont de l'ordre de 45% pour le contrôle F0.4, de 57% chez le clone S1.7, de 33% chez le clone F+12 et de 25% pour la cellule HepG2. Il est à noter que la présence de chloroquine n'aurait d'effet significatif sur l'hydrolyse des EC-HDL que chez le clone S1.7.

Donc ces expériences ont confirmé dans d'autres clones cellulaires de cellules HepG2, sauf S1.7. que les LDL empruntent plutôt la voie lysosomale et que les HDL utilisent de préférence la voie extralysosomale. Elles ont aussi démontré que la L-FABP ne module en rien ces voies d'hydrolyse.

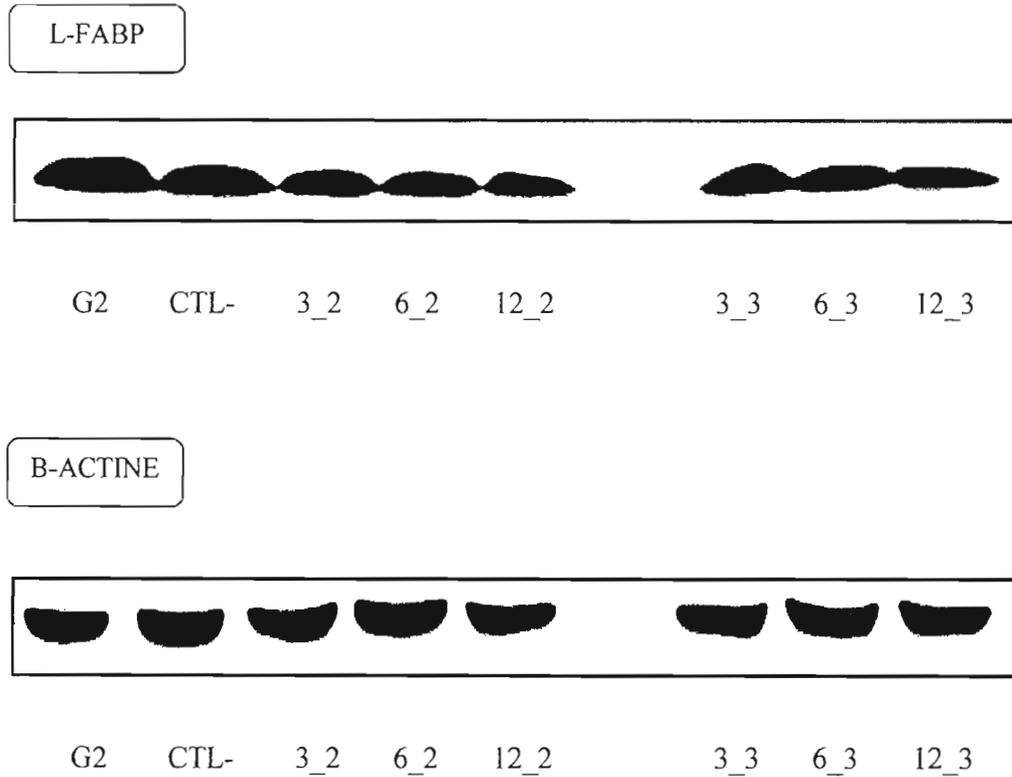


**Figure 11** :Efficacité d'hydrolyse des esters de cholestérol des HDL par des cellules HepG2 exprimant la L-FABP à différents niveaux Les cellules dans des plats de culture de 12 puits ont été prétraitées (T) ou pas avec 100  $\mu$ M de chloroquine pendant 1h, puis ont été incubées avec, 20  $\mu$ g de HDL marquées au niveau lipidique avec du  $^3$ H-EC, par ml de milieu pendant 4 heures à 37°C. Les cellules. En ajoutant des lipoprotéines non marquées (1,5 mg de protéines par ml), l'association non spécifique est déterminée. La soustraction de cette dernière à l'association totale fournit ainsi l'association lipidique spécifique des EC des HDL. Les lipides ont été extraits et séparés par chromatographie sur couche mince. La radioactivité incorporée dans les EC et le CL a été mesurée et le pourcentage d'hydrolyse calculé. Toutes les valeurs exposées ci-dessus sont exprimées en moyennes  $\pm$  S.E.M. N=2. F+ désigne un clone surexprimant la L-FABP, F0 un clone contrôle, S1.7 un clone surexprimant SR-BI, G2 les cellules HepG2 et T un traitement à la chloroquine. (\*) indique une différence significative par rapport à l'absence de traitement: \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.6 *Autres stratégies abordées*

Afin de vérifier une implication de la L-FABP dans la captation des EC des LDL et HDL, d'autres stratégies ont été abordées. Premièrement, nous avons voulu tester la possibilité qu'une sous expression de la L-FABP aurait eu un impact sur la gestion des LDL- et HDL-CE. En effet cette possibilité subsistait dans le cas où le taux d'expression de la L-FABP dans les cellules contrôles était déjà optimal et ne laissait pas de place à la détection de l'effet d'une sur-expression. La stratégie s'est orientée vers une interférence à l'ARN de la protéine cible. En effet, en interrompant la production de la L-FABP et en faisant des tests d'association et d'hydrolyse des EC, il aurait peut-être été possible de démystifier le rôle exact de cette protéine dans les réactions nous intéressant. Ainsi, des duplexes de petits ARN interférents à la séquence d'ARN cible ont été transfectés dans des cellules HepG2 une fois par jour pendant 2 ou 3 jours consécutifs, en faisant varier la quantité d'agent de transfection. Les résultats issus de ce protocole demeurent toutefois préliminaires dans la mesure où l'effectivité des nombreuses optimisations apportées depuis n'a pu être investiguée. La Fig. 12 à la page 62 montre l'expression de la L-FABP en fonction du traitement subi par les cellules et le tableau II fournit une idée chiffrée de l'impact de ce traitement. Les deux séquences interférentes ont sensiblement produit les mêmes taux de réduction. Notamment, avec 6  $\mu$ l d'agent de transfection par  $\mu$ g d'ADN, pour les séquences 2 et 3 ; 24,6 et 25,4% de diminution d'expression de la L-FABP par rapport au niveau de la cellule HepG2 ont été remarqués. Le meilleur résultat obtenu, s'avère être en présence de 12  $\mu$ l d'agent de transfection par  $\mu$ g d'ADN. En effet, dans ces conditions, la réduction de l'expression a été respectivement de 33,6 et 35,8% pour les séquences 2 et 3.

Parallèlement, une stimulation de l'expression de la L-FABP par le biais d'exposition à des agonistes spécifiques des PPAR $\alpha$  a été tentée. Ainsi, du Bezafibrate et du WY 14.643 ont été utilisés à ces fins. Pendant 3 jours, des cellules HepG2 ont été



**Figure 12 :** Niveaux protéiques de la L-FABP et de la  $\beta$ -actine au niveau des cellules HepG2 après l'application d'une stratégie d'interférence à l'ARNm codant pour la L-FABP. Les cellules dans des plats de culture de 12 puits ont été mises en contact avec le mélange séquence interférente-agent de transfection pendant 48 heures. Après une extraction protéique cellulaire, 50  $\mu$ g de protéines de chaque extrait ont été soumis à un SDS-PAGE, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les anticorps dirigés contre les protéines cibles ont été appliqués préalablement à une révélation par chimiluminescence. G2 représente le résultat obtenu pour les cellules HepG2, CTL- représente le résultat d'une transfection avec une séquence non interférente. Le premier chiffre des autres identifications représente le volume en  $\mu$ l d'agent de transfection par  $\mu$ g d'ADN et le deuxième, le numéro de la séquence interférente.

**Tableau IV:**Taux d'expression de la L-FABP au niveau cellules HepG2 après interférence à l'ARNm codant pour la L-FABP. Les cellules dans des plats de culture de 12 puits ont été mises en contact avec le mélange séquence interférente-agent de transfection pendant 48 heures. Après une extraction protéique, 50 µg de protéines de chaque extrait ont été soumis à un SDS-PAGE, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les anticorps dirigés contre les protéines cibles ont été appliqués préalablement à une révélation par chimiluminescence. La prise de données chiffrées a été réalisée par densitométrie. G2 représente le résultat obtenu pour les cellules HepG2, CTL- représente le résultat d'une transfection avec une séquence non interférente. Le premier chiffre des autres identifications représente le volume en µl d'agent de transfection par µg d'ADN et le deuxième, le numéro de la séquence interférente.

<b>Échantillon</b>	<b># Séquence SiRNA utilisée</b>	<b>Quantité (µg) d'agent de transfection par µg d'ADN</b>	<b>Expression (%)</b>
<b>G2</b>	-	0	100
<b>Contrôle (-)</b>	-	12	90,4
<b>3_2</b>	2	3	88,6
<b>6_2</b>	2	6	75,4
<b>12_2</b>	2	12	66,4
<b>3_3</b>	3	3	71,6
<b>6_3</b>	3	6	74,6
<b>12_3</b>	3	12	64,2

exposées à 1 mM de Bezafibrates et 0,33 mM de WY 14.643 avant une extraction des protéines cellulaires totales. Les lysats recueillis devaient être utilisés pour une estimation de l'expression de la L-FABP par immunobuvardage.

Ces deux stratégies n'ont pu être menées à terme à cause de la difficulté rencontrée pour obtenir de nouveau des anticorps fonctionnels spécifiques à la L-FABP. Après des mois d'attente de production des anticorps anti-L-FABP par la compagnie Abnova, puis de tentatives de mise au point d'un protocole efficace avec trois autres anticorps commerciaux, il a fallu se résigner à devoir mettre de côté ces expériences et leur optimisation tout en sachant qu'elles auraient peut-être apporté une contribution majeure à ce projet.

## 4 DISCUSSION

### 4.1 *Impact des LDL sur les principaux acteurs de la captation de leurs esters de cholestérol.*

Les résultats présentés dans les figures 1 et 2 révèlent que les quantités de LDL (50 et 250 µg/ml) mises en contact avec les cellules n'ont provoqué aucune variation significative ni au niveau des taux d'ARNm de SR-BI et de la L-FABP, ni en ce qui concerne l'expression protéique des L-FABP, SR-BI et rLDL. Un aspect de cette situation a été mis en évidence par Havekes *et al.* (1986) et Tam *et al.* (1991) qui indiquaient une très faible modulation de l'expression du rLDL par les EC-LDL et le 25-OH cholestérol chez les cellules HepG2. Havekes *et al.* (1987) révèlent que l'incubation avec des LDL provoque une forte augmentation de l'activité de l'ACAT. Ainsi, les EC-LDL, une fois captés, sont dirigés majoritairement vers des stocks de cholestérol estérifié ou d'autres stocks que celui du cholestérol libre qui régule l'expression du rLDL. Lombardi *et al.* (1993) remarquent aussi chez les cellules HepG2, un faible rendement dans le processus de dégradation lysosomale des LDL qui contribue à justifier le faible impact des EC-LDL sur l'expression du rLDL.

En ce qui concerne SR-BI, l'expression de ce récepteur après exposition aux EC-LDL n'a pas été documentée. Cependant, l'absence de réponse du SR-BI en ARNm ou en protéine est justifiable. En effet, bien qu'ayant la capacité de capter sélectivement les EC-LDL (Stangl *et al.* 1999), SR-BI n'est pas régulé par le flux de cholestérol entrant dans le foie, comme l'ont suggéré Wang *et al.* (1996) et Spady *et al.* (1998).

Les taux de L-FABP n'ont pas varié suite à ce même traitement aux EC-LDL. La captation et la dégradation des LDL engendre des acides gras (Brown et Goldstein, 1985) qui activent les PPAR $\alpha$  (Clarke et Jump, 1996 ; Kliewer *et al.* 1997) et par conséquent les gènes de la L-FABP (Meunier-Durmort *et al.* 1996) et du SR-BI (Malerød *et al.* 2003 ; Lopez et McLean, 2006). Le faible rendement de dégradation lysosomale des LDL montré par Lombardi *et al.* (1993) et le fait que 70% des LDL sont pris en charge par le rLDL (Havekes *et al.* 1987) peuvent tout à fait justifier l'absence de réponse de la L-FABP. En effet, dans ce processus métabolique, la réaction limitante étant celle qui fournit les acides gras, activateurs des gènes de la L-FABP, il n'est pas anormal qu'une absence de modulation de cette protéine suite à une exposition aux LDL soit remarquée.

#### ***4.2 La surexpression de la L-FABP dans des hépatocarcinomes humains HepG2 n'affecte pas les niveaux d'expression de SR-BI.***

Rhains *et al.* (2004) ont démontré que la surexpression de SR-BI dans des cellules HepG2 entraîne une augmentation des taux de la L-FABP soutenant que SR-BI par ce fait, module indirectement le métabolisme des acides gras. D'après les données obtenues (Tableau I), cette réaction n'est effective que dans un sens. En effet, la surexpression la L-FABP dans des HepG2 n'occasionne pas nécessairement d'augmentation des taux de SR-BI exprimés. La L-FABP se contente donc de traiter les acides gras issus de l'hydrolyse des esters de cholestérol des LDL et HDL captés par SR-BI, les menant ensuite à la mitochondrie en vue d'une  $\beta$ -oxydation. La L-FABP serait ainsi dépendante du rendement et de l'expression de SR-BI dans le cadre du métabolisme du cholestérol.

### ***4.3 Impact de la L-FABP sur la captation sélective des esters de cholestérol provenant des LDL et HDL***

Plusieurs études ont préalablement démontré que l'association aux cellules et la captation sélective des EC des LDL (Swarnakar *et al.* 1999 ; Rhainds *et al.* 2004) et des HDL (Connelly *et al.* 2003 ; Rhainds *et al.* 2004) sont proportionnelles au niveau d'expression de SR-BI. Les figures 4 à 9 ont confirmé la prévalence de l'expression de SR-BI sur celle de la L-FABP dans le processus de captation sélective des EC des LDL et des HDL. En effet, en présence de LDL ou de HDL les rendements d'association et de captation sélective sont dépendants de la quantité de SR-BI exprimés. Par exemple, en comparant les clones S1.7 et F+12, qui expriment respectivement 2,4 et 2,1 fois plus de L-FABP que des HepG2, la différence de rendement observée sur les figures 4 à 9 illustre parfaitement le rôle de SR-BI dans ces processus. Rhainds *et al.* en 2004, avaient déjà remarqué ces corrélations entre l'association lipidique, protéique et la captation sélective et les taux de SR-BI exprimés. Il est ainsi normal que les clones exprimant le plus SR-BI soient les plus performants une fois exposés aux EC. D'ailleurs, les réponses faibles des clones possédant des hauts niveaux de L-FABP seuls, lors de cette expérience, soulignent le fait que cette protéine interviendrait après le processus de captation sélective afin de prendre en charge les EC ou AG issus de la captation sélective. Cela met en évidence le fait que la L-FABP est tributaire de l'expression ou du rendement de SR-BI et que ce dernier est l'élément limitant de ce processus.

### ***4.4 Contribution de la L-FABP à l'hydrolyse des esters de cholestérol des LDL et HDL***

Il est acquis, selon plusieurs études que les EC des LDL internalisés par le rLDL sont hydrolysés par la cholestéryl ester hydrolase acide lysosomale (ACEH) (Brown et

Goldstein, 1984 ; Brown et Goldstein, 1986). En ce qui concerne les EC des HDL pris en charge par SR-BI, leur hydrolyse est extralysosomale et est réalisée par une hydrolase neutre (NCEH) (De Lamatre *et al.* 1993 ; Shimada *et al.* 1994). Les expériences menées ici ont confirmé ce qui a été indiqué par la littérature. En effet, l'impact de la chloroquine comme agent lysosomotrope sur l'hydrolyse des EC des LDL a été considérable sur les cellules ayant des taux relativement normaux de SR-BI (Fig. 10). La conséquence quasi inexistante de l'emploi de chloroquine sur le clone surexprimant SR-BI lors de l'hydrolyse des EC des LDL met en avant la propension de ce récepteur à prendre en charge ces esters de cholestérol des LDL lorsque la voie d'hydrolyse lysosomale est bloquée ou saturée (Connelly *et al.* 2003).

L'hydrolyse des EC des HDL n'a pas été statistiquement différente chez tous les clones soumis à un traitement à la chloroquine. Toutefois, la baisse drastique d'hydrolyse observée chez le clone surexprimant SR-BI n'illustre que trop, comme l'ont fait remarquer Rhainds *et al.* (1999), la possibilité d'utilisation par les EC des HDL les voies lysosomales et extralysosomales. La partie protéique des HDL est faiblement dégradée tandis que les EC qui la composent sont hydrolysés à l'intérieur ou l'extérieur des lysosomes. Alors que les EC et protéines des LDL sont dégradées de façon efficiente dans les lysosomes.

Cependant, la voie d'hydrolyse des EC, qu'ils proviennent des LDL ou HDL, n'a été affectée en aucun cas chez les clones surexprimant la L-FABP. Cela révèle l'exclusivité du SR-BI à prendre en charge le cholestérol provenant des lipoprotéines et ce même si la L-FABP a les capacités de lier ce substrat *in vitro* (Bass *et al.* 1985 ; Vincent *et al.* 1985). De plus, elle n'influe aucunement sur les voies d'hydrolyse des EC.

#### 4.5 Interférence à l'ARNm de la L-FABP et effet des agonistes des PPAR $\alpha$

Lors de ces expériences, des diminutions d'expression de l'ordre de 35% ont été atteintes. La L-FABP représentant entre 2 et 5% des protéines cytoplasmiques dans les hépatocarcinomes humains (Thompson *et al.* 1999), une plus grande diminution de son expression serait préférable afin de pouvoir vérifier le rôle de cette protéine dans le processus de captation sélective des EC des lipoprotéines. Sachant que la demi-vie de cette protéine est de 3,1 jours (Bass *et al.* 1985) et dans le but d'obtenir des diminutions d'expression plus importantes, des temps de traitement plus longs ont été préconisés de façon à ce que la séquence interférente lie le plus d'ARNm de la L-FABP possible. En ce qui concerne les cellules traitées aux agonistes des PPAR $\alpha$ , il aurait été intéressant de vérifier l'impact de ces substances sur l'expression, des récepteurs étudiés, de la L-FABP et de constater la portée des modulations attendues sur les processus faisant partie intégrante du métabolisme du cholestérol. Cependant, la mise au point du protocole d'immunodétection de la L-FABP, qui s'avère être l'expérience faisant la preuve de l'effectivité de la technique d'interférence à l'ARN ou de la stimulation par les agonistes des PPAR $\alpha$ , n'a pas pu être menée à terme.

## 5 CONCLUSION

La surexpression de la L-FABP n'a pas montré d'effet sur les rendements et taux de captation sélective des LDL et HDL. De plus, il n'y a pas eu d'impact sur les voies d'hydrolyse empruntées par les EC des LDL et HDL. Cependant, la forte expression basale de la L-FABP constatée dans les cellules HepG2 ne suffirait-elle pas à expliquer à elle seule l'absence d'impact de la surexpression de cette protéine sur la captation des EC des LDL et HDL. Ainsi, le pool de L-FABP intracellulaire basal disponible fournirait une réponse amplement suffisante en cas d'entrée subite d'EC dans la cellule.

L'impact d'une faible expression de la L-FABP sur la captation sélective des LDL et HDL reste toujours inconnu mais devrait néanmoins susciter un certain attrait, tout comme l'implication d'autres transporteurs de stérols et d'acides gras dans le métabolisme du cholestérol face, à une exposition aux lipoprotéines de faible et de forte densité, et à la diminution de la L-FABP.

Le SCP-2 « Sterol Carrier Protein 2 » est connu pour sa capacité à lier le cholestérol membranaire, mais il ne demeure pas moins un transporteur possédant des ligands en commun avec la L-FABP (Schroeder *et al.* 1998 ; Starodub *et al.* 2000). Avec un poids de 15 kDa, cette protéine a montré une forte implication dans le transport du cholestérol. Son expression a provoqué une modulation du trafic du cholestérol dans la cellule, non seulement au niveau membranaire, mais tout particulièrement auprès du cholestérol nouvellement synthétisé (Puglielli *et al.* 1995). Murphy et Schroeder (1997) ont relevé une augmentation de la captation du cholestérol exogène chez des cellules surexprimant SCP-2, par stimulation du trafic de ce dernier de la membrane plasmique aux microsomes. Avec toutes ces observations, il serait judicieux de se

pencher vers ce transporteur de stérols pour une éventuelle participation dans la captation des esters de cholestérol provenant des lipoprotéines.

## 6 BIBLIOGRAPHIE

- ABUMRAD, N.A., EL-MAGHRABI, M.R., AMRI, E.Z., LOPEZ, E., GRIMALDI, P.A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* **268**: 17665-17668.
- ABUMRAD, N., COBURN, C., IBRAHIMI, A. (1999). Membrane proteins implicated in long chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**: 4-13.
- ACTON, S.L., SCHERER, P.E., LODISH, H.F., KRIEGER, M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* **33**: 21003-21009.
- ACTON, S., RIGOTTI, A., LANDSCHULTZ, K.T., XU, S., HOBBS, H.H., KRIEGER, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a HDL lipoprotein receptor. *Science* **271**: 518-520.
- ACTON, S.L., KOZARSKY, K.F., RIGOTTI, A. (1999). The HDL receptor SR-BI: a new therapeutic target for atherosclerosis? *Mol. Med. Today* **5**: 518-524.
- ANDERSON, R.G., KAMEN, B.A., ROTHBERG, K.G., LACEY, S.W. (1992). Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **255**: 410-411.
- ANTONENKOV, V.D., SORMUNEN, R.T., OHLMEIER, S., AMERY, L., FRANSEN, M., MANNAERTS, G.P., HILTUNEN, J.K. (2006). Localization of a portion of the liver isoform of fatty-acid-binding protein (L-FABP) to peroxisomes. *Biochem. J.* **394**: 475-484.
- ARAI, T., WANG, N., BEZOUJEVSKY, M., WELCH, C., TALL, A.R. (1999). Decreased atherosclerosis in heterozygous LDL lipoprotein receptor deficient mice expressing the SR-BI transgene. *J. Biol. Chem.* **274**: 2366-2371.
- ATSHAVES, B.P., STOREY, S.M., HUANG, H., SCHROEDER, F. (2004). Liver fatty acid binding protein expression enhances branched-chain fatty acid metabolism. *Mol. Biol. Chem.* **259**: 115-129.

- BABITT, J., TRIGATTI, B., RIGOTTI, A. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* **272**: 13242-13249.
- BASS, N.M., MANNING, J.A., OCKNER, R.K. (1985). Turnover and short-term regulation of fatty acid binding protein in liver. *J. Biol. Chem.* **260**: 9603-9607.
- BASS, N.M. (1988). The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation, and function. *Int. Rev. Cytol.* **III**:143-184.
- BERNEIS, K.K., KRAUSS, R.M. (2002). Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J. Lipid Res.* **43**: 1363-1379.
- BERNLOHR, D.A., SIMPSON, M.A., HERTZEL, A.V., BANASZAK, L.J. (1997). Intracellular lipid binding proteins and their genes. *Annu. Rev. Nutr.* **17**: 277-303.
- BERRY, S.A., YOON, J.B., LIST, J., SEELIG, S. (1993). Hepatic fatty acid-binding protein mRNA is regulated by growth hormone. *J. Am. Coll. Nutr.* **12**: 638-642.
- BORDEWICK, U., HEESE, M., BORCHERS, T., ROBENEK, H., SPENER, F. (1989). Compartmentation of hepatic fatty-acid-binding protein in liver cells and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **370**: 229-238.
- BRISSETTE, L., FALSTRAULT, L. (1994). Analysis of the selective uptake of the cholesteryl ester of human intermediate density lipoproteins by HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1213**: 5-13.
- BRISSETTE, L., CHAREST, M.C., FALSTRAULT, L. (1996). Selective uptake of cholesteryl esters of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein-binding site in HepG2 cells and is followed by the hydrolysis of cholesteryl esters. *Biochem. J.* **318**: 841-847.
- BRISSETTE, L., CHAREST, M.C., FALSTRAULT, L., LAFOND, J., RHAINDS, D., TREMBLAY, C., TRUONG, T-Q. (1999). Selective uptake of cholesteryl esters from various classes of lipoproteins by HepG2 cells. *Biochem. Cell Biol.* **77**: 157-163.
- BRODEUR, M.R., LUANGRATH, V., BOURRET, G., FALSTRAULT, L., BRISSETTE, L. (2005). Physiological importance of SR-BI in the *in vivo* metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J. Lipid Res.* **46**: 687-696.

- BROWN, M.S., KOVANEN, P.T., GOLDSTEIN, J.L. (1981). Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* **212**: 628-635.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. (1985). The receptor model for transport of cholesterol in plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **454**: 178-182.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**: 34-47.
- CALVO, D., 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**: 18929-18935.
- CAMPOS, H., PERLOV, D., KHOO, C., SACKS, F.M. (2001). Distinct patterns of lipoproteins with apoB defined by presence of apoE or apoC-III in hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* **42**: 1239-1249.
- CARLSSON, L., LINDÉN, D., JALOULI, M., OSCARSSON, J. (2001). Effects of fatty acids and growth hormone on liver fatty acid binding protein and PPAR $\alpha$  in rat liver. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**: 772-781.
- CARLSSON, L. (2002). Growth hormone regulation of L-FABP and PPAR $\alpha$ : genes involved in hepatic lipid metabolism. Department of Physiology and Pharmacology, Göteborg University.
- CESSAC-GUILLEMET, A.L., MOUNIER, F., BOROT, C., BAKALA, H., PERICHON, M., SCHAEVERBEKE, M., SCHAEVERBEKE, J. (1996). Characterization and distribution of albumin binding protein in normal rat kidney. *Am. J. Physiol.* **271**: 101-107.
- CHAO, H., ZHOU, M., MCINTOSH, A., SCHROEDER, F., KIER, A.B. (2002). Acyl CoA binding protein and cholesterol differentially alter fatty acyl CoA utilization by microsomal acyl CoA: cholesterol transferase. *J. Lipid Res.* **44**: 72-83.
- CHAREST, M. C., RHAINDS, D., FALSTRAULT, L., MATZOURANIS, T., BRISSETTE, L. (1999). Selective uptake of cholesteryl ester from low density lipoprotein is involved in HepG2 cell cholesterol homeostasis. *Eur. J. Biochem.* **263**: 402-409.
- CHEN, S.H., HABIB, G., YANG, C.Y., GU, Z.W., LEE, B.R., WENG, S.A., SILBERMAN, S.R., CAI, S.J., DESLYPERE, J.P., ROSSENEU, M., GOTTO, A.M. JR., WEN-HSIUNG, L., CHAN, L. (1987). Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* **238**: 363-366.

CLARKE, S.D., JUMP, D.B. (1996). Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutr.* **126**: 1105-1109.

CONNELLY, M.A., KELLNER-WEIBEL, G., ROTHBLAT, G.H. WILLIAMS, D.L. (2003). SR-BI-directed HDL-cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* **44**: 331-341.

DAVIDSON, N.O., GLICKMAN, R.M. (1985). Apolipoprotein A-I synthesis in rat small intestine: regulation by dietary triglyceride and biliary lipid. *J. Lipid Res.* **26**: 368-379.

DAVIDSON, N.O., SHELNESS, G.S. (2000). Apolipoprotein B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu. Rev. Nutr.* **20**: 169-193.

DE LAMATRE, J.G., CARTER, R.M., HORNICK, C.A. (1993). Evidence that a neutral cholesteryl ester hydrolase is responsible for the extralysosomal hydrolysis of high-density lipoprotein cholesteryl ester in rat hepatoma cells (Fu5AH). *J. Cell Physiol.* **157**: 164-168.

DESVERGNE, B., WAHLI, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* **20**: 649-688.

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

DURBIN D.M., JONAS, A. (1999). Lipid-free apolipoproteins A-I and A-II promote remodeling of reconstituted high density lipoproteins and alter their reactivity with lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.* **40**: 2293-2302.

EISENBERG, S. (1984). High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* **10**: 1017-1058.

EISENBERG, S. (1999). High density lipoprotein metabolism, London: *Arnold, Hodder Headline Group*, 71-85.

EROL E., KUMAR L.S., CLINE, G.W., SHULMAN, G.I., KELLY, D.P., BINAS, B. (2004). Liver fatty acid-binding protein is required for high rates of hepatic fatty acid oxidation but not for the action of PPAR- $\alpha$  in fasting mice. *FASEB. J.* **18**: 347-349.

ESCHER, G., KROZOWSKI, Z., CROFT, K.D., SVIRIDOV, D. (2003). Expression of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) enhances cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* **278**: 11015-11019.

FIELDING, C.L., SHORE, V.G., FIELDING, P.E. (1972). A protein co factor of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res.* **46**: 1493-1498.

FIELDING, C.J. (1984). The origin and properties of free cholesterol potential gradients in plasma, and their relation to atherogenesis. *J. Lipid Res.* **25**: 1624-1628.

FIELDING, P.E., FIELDING, C.J. (1996). Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry* **35**: 14932-14938.

FIELDING, C.J., FIELDING, P.E. (2000). Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1529**: 210-222.

FIELDING, C.J., FIELDING, P.E. (2001). Cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta* **1533**: 175-189.

FLUITER, K., BERKEL VAN, T.J.C. (1997). SR-BI substrates inhibit the selective uptake of high density- lipoprotein cholesteryl esters by rat parenchymal liver cells. *J. Biochem.* **326**: 515-519.

GAUTIER, T., MASSON, D., JONG, M.C., DUVERNEUIL, L., LE GUERN, N., DECKERT, V., PAIS DE BARROS, J.P., DUMONT, L., BATAILLE, A., ZAK, Z., JIANG, X.C., TALL, A.R., HAVEKES, L.M., LAGROST, L. (2002). Apolipoprotein C-I deficiency markedly augments plasma lipoprotein changes mediated by human cholesteryl ester transfer protein (CETP) in CETP transgenic/apoC1-knocked out mice. *J. Biol. Chem.* **277**: 31354-31363.

GINSBERG, H.N., DIXON, J.L., GOLDBERG, I.J. (1999). VLDL/LDL cascade system: assembly, secretion and intravascular metabolism of apoprotein B-containing lipoproteins, London: *Arnold, Hodder Headline Group*, 55-70.

GLATZ, J.F.C., STORCH, J. (2001). Unravelling the significance of cellular fatty acid binding proteins. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**: 267-227.

GOLDBERG, I.J., SCHERALDI, C.A., YACOUB, L.K., SAXENA, U., BISGAIER, C.L. (1990). Lipoprotein apoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J. Biol. Chem.* **265**: 4266-4272.

GOLDSTEIN, J.L., HOBBS, H.H., BROWN, M. S. (2000). Familial Hypercholesterolemia, New York, NY: *McGraw-Hill Publishing Co.* 2863-2913.

- GRAF, G.A., CONNELL, P.M., VAN DER WESTHUYZEN, D.R., SMART, E.J. (1999). The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters into caveolae. *J. Biol. Chem.* **274**: 12043-12048.
- GREEN, S.R., PITTMAN, R.C. (1991). Selective uptake of cholesteryl esters from low density lipoproteins *in vitro* and *in vivo*. *J. Lipid Res.* **32**: 667-678.
- GREENWALT, D.E., LIPSKY, R.H., OCKENHOUSE, C.F., IKEDA, H., TANDON, N.N., JAMIESON, G.A. (1992). Membrane glycoprotein CD36: a review of its role in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* **80**: 1105-1115.
- HATCH, F.T., LEES, R.S. (1968). Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv. Lipid Res.* **6**: 1-68.
- HAVEKES, L.M., DE WIT, E., PRINCEN, H.M. (1987). Cellular free cholesterol in Hep G2 cells is only partially available for down-regulation of low-density-lipoprotein receptor activity. *Biochem. J.* **247**: 739-746.
- HAVEKES, L.M., VERBOOM, H., DE WIT, E., YAP, S.H., PRINCEN, H.M. (1986). Regulation of low density lipoprotein receptor activity in primary cultures of human hepatocytes by serum lipoproteins. *Hepatology* **6**: 1356-1360.
- HAVEL, R.J., HAMILTON, R.L. (1988). Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology* **8**: 1689-1704.
- HUI, T.Y., BERNLOHR, D.A. (1997). Fatty acid transporters in animal cells. *Front. Biosci.* **2**: 222-231.
- ISSEMAN, I., GREEN, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators, *Nature* **347**: 645-650.
- JAHN, C.E., OSBORNE, J.C. Jr., SCHAEFER, E.J., BREWER, H.B. Jr. (1983). Activation of the enzymic 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.
- JEFFERSON, J.R., POWELL, D.M., RYMASZEWSKI, Z., KUKOWSKA-LATALLO, J., LOWE, J.B., SCHROEDER, F. (1990). Altered membrane structure in transfected mouse l-cell fibroblasts expressing rat liver fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* **265**: 11062-11068.

JEFFERSON, J.R., SLOTTE, J.P., NEMECZ, G., PASTUSZYN, A., SCALLEN, T.J., SCHROEDER, F. (1991). Intracellular sterol distribution in transfected mouse L-cell fibroblasts expressing rat liver fatty acid-binding protein, *J. Biol. Chem.* **266**: 5486-5496.

JIAN, B., DE LA LLERA-MOYA, M., JI, Y., WANG, N., PHILLIPS, M.C., SWANEY, J.B., TALL, A.R., ROTHBLAT, G.H. (1998). Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J. Biol. Chem.* **273**: 5599-5606.

JOHNSON, M.S.C., SVENSSON, P.A., HELOU, K., BILLIG, H., LEVAN, G., CARLSSON, L.M.S., CARLSSON, B. (1998). Characterization and chromosomal localization of rat SR-BI, a HDL lipoprotein receptor with a putative leucine-zipper domain and Peroxysomal Targeting Sequence. *Endocrinology* **139**: 72-80.

JONAS, A. (1991). Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1084**: 205-220.

JONAS, A., VON ECKARDSTEIN, A., CHURGAY, L., MANTULIN, W.W., ASSMANN, G. (1993). Structural and functional properties of natural and chemical variants of apolipoprotein A-I. *Biochim. Biophys. Acta* **1166**: 202-210.

KAUKAUS, R.M., SUI, Z., LYSENKO, N., WU, N.Y., ORTIZ DE MONTELLANO, P.R., OCKNER, R.K., BASS, N.M. (1993). Regulation of pathways of extramitochondrial fatty acid oxidation and liver fatty acid-binding protein by long-chain monocarboxylic fatty acids in hepatocytes. Effect of inhibition of carnitine palmitoyltransferase I. *J. Biol. Chem.* **268**: 26866-26871.

KELLER, H., DREYER, C., MEDIN, J., MAHFOUDI, A., OZATO, K., WAHLI, W. (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 2160-2164.

KERSTEN, S., SEYDOUX, J., PETERS, J.M., GONZALEZ, F.J., DESVERGNE, B., WAHLI, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* **103**: 1489-1498.

KLIEWER, S.A., SUNDSETH, S.S., JONES, S.A., BROWN P.J., WISELY, G.B., KOBLE, C.S., DEVCHAND, P., WAHLI, W., WILLSON, T.M., LENHARD, J.M., LEHMANN, J.M. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 4318-4323.

KNECHT, T.P., PITTMAN, R.C. (1989). A membrane pool of reversibly cell-associated cholesteryl esters that may mediate the selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoproteins by murine adrenal cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1002**: 365-375.

KOWAL, R.C., HERZ, J., GOLDSTEIN, J.L., ESSER, V., BROWN, M.S. (1989). Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 5810-5814.

KOWAL, R.C., HERZ, J., WEISGRABER, K.H., MAHLEY, R.W., BROWN, M.S., 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**: 10771-10779.

KOZARSKY, K.F., DONAHEE, M.H., RIGOTTI, A., IQBAL, S.N., EDELMAN, E.R., KRIEGER, M. (1997). Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* **387**: 414-417.

KRAJEWSKA, W.M., MASLOWSKA, I. (2004). Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol. Biol. Lett.* **2**: 195-220.

KRAUSS, R.M. BURKE, D.J. (1982). Identification of multiple subfractions of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J. Lipid Res.* **23**: 97-104.

KRIEGER, M., HERZ, J. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 601-637.

LAGROST, L., GAMBERT, P., DANGREMONT, V., ATHIAS, A., 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**: 1569-1575.

LAGROST, L., PERSEGOL, L., LALLEMANT, C., GAMBERT, P. (1994). Influence of apolipoprotein composition of high density lipoprotein particles on cholesteryl ester transfer protein activity. Particles containing various proportions of apolipoproteins A-I and A-II. *J. Biol. Chem.* **269**: 3189-3197

LAGROST, L., DANGREMONT, 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**: 13004-13009.

- LANDSCHULTZ, T., PATHAK, R., RIGOTTI, A., KRIEGER, M., 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**: 984-995.
- LANGER, T., STROBER, W., LEVY, R.I. (1972). The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* **51**: 1528-1536.
- LEBLOND, L., MARCEL, Y.M. (1991). The amphipatic alpha-helical repeats of apolipoprotein A-I are responsible for the binding of high density lipoproteins to HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 6058-6067.
- LI, W.P., LIU, P., PILCHER, B.K., ANDERSON, R.G. (2001). Cell specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm and mitochondria. *J. Cell Sci.* **114**: 1397-1408
- LINDEN, D., LINDBERG, K., OSCARSSON, J., CLAEISSON, C., ASP, L., LI, L., GUSTAFSSON, M., BOREN, J., OLOFSSON, S.O. (2002). Influence of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (apo) B-100 and apoB-48. *J. Biol. Chem.* **277**: 23044-23053.
- de la LLERA-MOYA, M., ROTHBLAT, G.H., CONNELLY, M.A., KELLNER-WEIBEL, G., SAKR, S.W., PHILLIPS, M.C., WILLIAMS, D.L. (1999). Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.* **3**: 575-580.
- LOMBARDI, P., MULDER, M., DE WIT, E., VAN BERKEL, T.J., FRANTS, R.R., HAVEKES, L.M. (1993). Low-density lipoproteins are degraded in HepG2 cells with low efficiency. *Biochem. J.* **290**: 509-514.
- LOPEZ, D., MCLEAN, M.P. (2006). Activation of the rat scavenger receptor class B type I gene by PPAR $\alpha$ . *Mol. Cell Endocrinol.* **251**: 67-77.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MCFARLANE, A. S. (1948). Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* **182**: 53-54.
- MAHLEY, R.W., INNERARITY, T.L., RALL, S.C. JR., WEISGRABER, K.H. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* **25**: 1277-1294.

- MAHLEY, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**: 622-630.
- MAHLEY, R.W., HUI, D.Y., INNERARITY, T.L., BEISIEGEL U. (1989). Chylomicron remnant metabolism. Role of hepatic lipoprotein receptors in mediating uptake. *Arteriosclerosis* **9**: 14-18.
- MALERØD, L., SPORSTØL, M., JUVET, L.K., MOUSAVI, A., GJØEN, T., BERG, T. (2003). Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor 4α. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**: 557-565.
- MAO, S.J., JACKSON, R.L., GOTTO, A.M. Jr., SPARROW, J.T. (1981). Mechanism of lipid-protein interaction in the plasma lipoproteins: identification of a lipid-binding site in apolipoprotein A-II. *Biochemistry* **20**: 1676-1680.
- MARTIN, G.G., HUANG, H., ATSHAVES, B.P., BINAS, B., SCHROEDER, F. (2003). Ablation of the liver fatty acid binding protein gene decreases fatty acyl CoA binding capacity and alters fatty acyl CoA pool distribution in mouse liver. *Biochemistry* **42**: 11520-11532.
- MARTIN, G.G., ATSHAVES, B.P., MCINTOSH, A.L., MACKIE, J.T., KIER, A.B., SCHROEDER, F. (2006). Liver fatty acid binding protein gene ablation potentiates hepatic cholesterol accumulation in cholesterol-fed female mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**: 36-48.
- MEUNIER-DURMORT, C., POIRIER, H., NIOT, I., FOREST, C., BESNARD, P. (1996). Up-regulation of the expression of the gene for liver fatty acid-binding protein by long-chain fatty acids. *Biochem. J.* **319**: 483-487.
- MIZUTANI, T., SONODA, Y., MINEGISHI, T., WAKABAYASHI, K., MIYAMOTO, K. (1997). Cloning, characterization, and cellular distribution of rat scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the ovary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**: 499-505.
- MURAO, K., TERPSTRA, V., GREEN, R.S., KONDRATENKO, N., STEINBERG, D., QUEHENBERGER, O. (1997). Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for HDL lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 17551-17557.
- MURPHY, E.J., PROWS, D.R., JEFFERSON, J. R., SCHROEDER F. (1996). Liver fatty acid binding protein expression in transfected fibroblasts stimulates fatty acid uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **1301**: 191-196.

MURPHY, E.J., PROWS, D.R., JEFFERSON, J.R., INCERPI, S., HERTELENDY, Z.I., HEYLIGER, C.E., SCHROEDER, F. (1996). Effect of insulin on fatty acid uptake and esterification in L-cell fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**: 267-272.

MURPHY, E. J., SCHROEDER, F. (1997). Sterol carrier protein-2 mediated cholesterol esterification in transfected L-cell fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1345**: 283-292.

NEMECZ, G., SCHROEDER, F. (1991). Selective binding of cholesterol by recombinant fatty acid-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 17180-17186.

NG, D.S., FRANCONI, O.L., FORTE, T.M., ZHANG, J.L., HAGHPASSAND, M., RUBIN, E.M. (1997). Disruption of the murine lecithin: cholesterol acyltransferase gene causes impairment of adrenal lipid delivery and up-regulation of scavenger receptor class B type I. *J. Biol. Chem.* **272**: 15777-15781.

NISHIDA, H.I., NAKANISHI, T., YEN, E.A., ARAI, H., YEN, F.T., NISHIDA, T. (1986). Nature of the enhancement of lecithin-cholesterol acyltransferase reaction by various apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* **261**: 12028-12035.

NORUM, K.R. (1977). The role of LCAT in cholesterol transport. *Adv. Exp. Med. Biol.* **82**: 427-431.

ORAM, J.F., VAUGHAN, A.M. (2000). ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* **3**: 253-260.

OUGUERRAM, K., KREMPF, M., MAUGEAIS, C., MAUGERE, P., DARMAUN, D., MAGOT, T. (2002). A new labelling approach using stable isotopes to study *in vivo* plasma cholesterol metabolism in humans. *Metabolism* **51**: 5-11.

PACKARD, C.J., SHEPHERD, J. (1999). Physiology of the lipoprotein transport system: an overview of lipoprotein metabolism, London: *Arnold, Hodder Headline Group*, 17-30.

PITAS, R.E., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W. (1980). Cell surface receptor binding of phospholipids protein complexes containing different ratios of receptor-active and -inactive E apoprotein. *J. Biol. Chem.* **255**: 5454-5460.

PITTMAN, R.C., KNECHT, T.P., ROSENBAUM, M.S., TAYLOR, C.A. JR. (1987). A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters. *J. Biol. Chem.* **262**: 2443-2450.

POHL, J., RING, A., HERMANN, T., STREMMEL, W. (2004). Role of FATP in parenchymal cell fatty acid uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **1686**: 1-6.

PÖRN, I., SLOTTE, J.P. (1995). Localization of cholesterol in sphingomyelinase-treated fibroblasts. *Biochem. J.* **308**: 269-274.

POWNALL, H., GOTTO, A. M., JR. (1999). Structure and dynamics of human plasma lipoproteins, New York: *Oxford University Press Inc.*, 3-15.

PUGLIELLI, L., RIGOTTI, A., GRECO, A.V., SANTOS, M. J., NERVI, F. (1995). Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **270**: 18723-18726.

REAVEN, E., NOMOTO, A., LEERS-SUCHETA, S., TEMEL, R., WILLIAMS, D.L., AZHAR, S. (1998). Expression and microvillar localization of scavenger receptor, class B (a high density lipoprotein receptor) in luteinized and hormone-desensitized rat ovarian models. *Endocrinology* **139**: 2847-2856.

REDDY, J.K. (2004). Peroxisome proliferators and peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$ . *Am. J. Pathol.* **164**: 2305-2321.

REDGRAVE, T.G. (1999). Chylomicrons, London: *Arnold, Hodder Headline Group*. 31-54.

REDGRAVE, T.G. (2004). Chylomicron metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* **32**: 79-82.

RHAINDS, D., FALSTRAULT, L., TREMBLAY, C., BRISSETTE, L. (1999). Uptake and fate of class B scavenger receptor ligands in HepG2 cells. *J. Biochem.* **261**: 227-235.

RHAINDS, D., BRODEUR, M., LAPOINTE, J., CHARPENTIER, D., FALSTRAULT, L., 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**: 7527-7538.

RHAINDS, D., BOURGEOIS, P., BOURRET, G., HUARD, K., FALSTRAULT, L., BRISSETTE, L. (2004). Localization and Regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J. Cell Sci.* **117**: 3095-3105.

RIGOTTI, A., EDELMAN, E.R., SEIFERT, P., IQBAL, S.N., DeMATTOS, R.B., TEMEL, R.E., KRIEGER, M., WILLIAMS, D.L. (1996). Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the *in vivo* expression of SR-BI, a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J. Biol. Chem.* **271**: 33545-33549.

RIGOTTI, A., TRIGATTI, B., BABITT, J., PENMAN, M., XU, S., KRIEGER, M. (1997). Scavenger receptor BI: a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* **8**: 181-188.

ROTHBERG, K.G., HEUSER, J.E., DONZELL, W.C., YING, Y.S., GLENNEY, J.R., ANDERSON, R.G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**: 673-682.

ROTHBLAT, G.H., DE LA LLERA-MOYA, M., ATGER, V., KELLNER-WEIBEL, G., WILLIAMS, D.L., PHILLIPS, M.C. (1999). Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J. Lipid Res.* **40**: 781-796.

SCHAFFER, J.E., LODISH, H.F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* **79**: 427-436.

SCHROEDER, F., ATSHAVES, B.P., STARODUB, O., BOEDEKER, A.L., SMITH, R.R. 3<sup>RD</sup>., ROTH, J.B., FOXWORTH, W.B., KIER, A.B. (2001). Expression of liver fatty acid binding protein alters growth and differentiation of embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biochem.* **219**: 127-138.

SCHROEDER, F., BUTKO, P., NEMECZ, G., JEFFERSON, J.R., POWELL, D., RYMASZEWSKI, Z., DEMPSEY, M.E., KUKOWSKA-LATALLO, J., LOWE, J.E. (1989). Sterol carrier protein: a ubiquitous protein in search of a function. *Bioengineered Molecules: Basic and Clinical and Aspects.* 29-45. Raven Press, New York.

SCHROEDER, F., FROLOV, A., SCHOER, J., GALLEGOS, A., ATSHAVES, B.P., STOLOWICH, N.J., SCOTT, A.I., KIER, A.B. (1998). Intracellular cholesterol trafficking (Chang, T.Y., and Freeman, D.A.) 213-234. *Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.*

SCHROEDER, F., JEFFERSON, J.R., KIER, A.B., KNITTELL, J., SCALLEN, T.J., WOOD, W.G., HAPALA, I. (1991). Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **196**: 235-252.

SCHROEDER, F., JOLLY, C.A., CHO, T.H., FROLOV, A. (1998). Fatty acid binding protein isoforms: structure and function. *Chem. Phys. Lipids* **92**: 1-25.

SCHROEDER, F., NEMECZ, G. (1989). Interaction of sphingomyelins and phosphatidylcholines with fluorescent dehydroergosterol. *Biochemistry* **28**: 5992-6000.

SCHROEDER, F., PETRESCU, A.D., HUANG, H., ATSHAVES, B.P., MCINTOSH, A.L., MARTIN, G.G., HOSTETLER, H.A., VESPA, A.,

LANDROCK, D., LANDROCK, K.K., PAYNE, H.R., KIER, A.B. (2008). Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids* **43**: 1-17.

SHIMADA, A., TAMAI, T., OIDA, K., TAKAHASHI, S., SUZUKI, J., NAKAI, T., MIYABO, S. (1994). Increase in neutral cholesteryl ester hydrolase activity produced by extralysosomal hydrolysis of high-density lipoprotein cholesteryl esters in rat hepatoma cells (H-35). *Biochim. Biophys. Acta* **1215**: 126-132.

SILVER, D.L., WANG, N., XIAO, X., 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**: 25287-25293.

SINGER, S.S., HENKELS, K., DEUCHER, A., BARKER, M., SINGER, J., TRULZSCH, D.V. (1996). Growth hormone and aging change rat liver fatty acid binding protein levels. *J. Am. Coll. Nutr.* **15**: 169-174.

SMART, E.J., GRAF, G.A., MCNIVEN, M.A., SESSA, W.C., ENGELMAN, J.A., SCHERER, P.E., OKAMOTO, T., LISANTI, M.P. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 7289-7304.

SOUTAR, A.K., GARNER, C.W., BAKER, H.N., SPARROW, J.T., JACKSON, R.L., GOTTO, A.M., SMITH, L.C. (1975). Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* **14**: 3057-3064.

SOUTAR, A.K. (1999). Low-density lipoprotein receptors, London: *Arnold, Hodder Headline Group*, 303-322.

SPADY, D.K., WOOLLETT, L.A., MEIDELL, R.S., HOBBS, H.H. (1998). Kinetic characteristics and regulation of HDL cholesteryl ester and apolipoprotein transport in the apoA-I<sup>-/-</sup> mouse. *J. Lipid Res.* **39**: 1483-1492.

STANGL, H., HYATT, M., HOBBS, H.H. (1999). Transport of lipids from high and low density lipoproteins via scavenger receptor-BI. *J. Biol. Chem.* **274**: 32692-32698.

STARODUB, O., JOLLY, C.A., ATSHAVES, B.P., ROTHS, J.B., MURPHY, E.J., KIER, A.B., SCHROEDER F. (2000). Sterol carrier protein-2 localization in endoplasmic reticulum and role in phospholipid formation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **279**: 1259-1269.

STORCH, J., THUMSER, A.E. (2000). The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**: 28-44.

SWARNAKAR, S., TEMEL, R.E., CONNELLY, M.A., AZHAR, S., WILLIAMS, D.L. (1999). Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J. Biol. Chem.* **274**: 29733-29739.

TAM, S.P., BRISSETTE, L., RAMHARACK, R., DEELEY, R.G. (1991). Differences between the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and low density lipoprotein receptor in human hepatoma cells and fibroblasts reside primarily at the translational and post-translational levels. *J. Biol. Chem.* **266**: 16764-16773.

TEMEL, R.E., TRIGATTI, B., DEMATTOS, R.B., AZHAR, S., KRIEGER, M., WILLIAMS, D.L. (1997). SR-BI, is the major route for the delivery of HDL lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 13600-13605.

THOMPSON, J., WINTER, N., TERWEY, D., BRATT, J., BANASZAK, L. (1997). The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. A complex with two bound oleates. *J. Biol. Chem.* **272**: 7140-7150.

THOMPSON, J., REESE-WAGONER, A., BANASZAK, L. (1999). Liver fatty acid binding protein: species variation and the accommodation of different ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**: 117-130.

THUMSER, A.E., WILTON, D.C. (1996). The binding of cholesterol and bile salts to recombinant rat liver fatty acid-binding protein. *Biochem. J.* **320**: 729-733.

THUMSER, A.E., STORCH, J. (2000). Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipid membranes by different mechanisms. *J. Lipid Res.* **41**: 647-656.

TIRUPPATHI, C., FINNEGAN, A., MALIK, A.B. (1996). Isolation and characterization of a cell surface albumin-binding protein from vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 250-254.

TRIGATTI, B.L., MANGROO, D., GERBER, G.E. (1991). Photoaffinity labeling and fatty acid permeation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **266**: 22621-22625.

VARBAN, M.L., RINNINGER, F., WANG, N., FAIRCHILD-HUNTRESS, V., DUNMORE, J.H., FANG, Q., GOSSELIN, M.L., DIXON, K.L., DEEDS, J.D., ACTON, S.L., TALL, A.R., HUSZAR, D. (1998). Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 4619-4624.

- VEERKAMP, J.H., VAN MOERKERK, H.T. (1993). Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Mol. Cell. Biochem.* **123**: 101–106.
- VEGA, M.A., SEGUI-REAL, A.B., GARCIA, J.A., CALES, C., RODRIGUEZ, F., VANDERKERCKHOVE, J., SANDOVAL, I.V. (1991). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP-II, a novel 74 kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* **268**: 18929-18935.
- VES-LOSADA, A., BRENNER, R. R. (1996). Long-chain fatty acyl-CoA synthetase enzymatic activity in rat liver cell nuclei. *Mol. Cell. Biochem.* **159**: 1-6.
- VIEIRA-VAN BRUGGEN, D., KALKMAN, I., VAN TOL, A., JANSEN, H. (1998). Induction of adrenal scavenger receptor BI and increased high density lipoprotein-cholesteryl ether uptake by *in vivo* inhibition of hepatic lipase. *J. Biol. Chem.* **273**: 32038-32041.
- VINCENT, S.H., MULLER-EBERHARD, U. (1985). A protein of the Z class of liver cytosolic proteins in the rat that preferentially binds heme. *J. Biol. Chem.* **260**: 14521–14528.
- WANG, N., WENG, W., BRESLOW, J.L., TALL, A.R. (1996). Scavenger receptor BI (SR-BI) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knock-out mice as a response to depletion of cholesterol stores. *J. Biol. Chem.* **271**: 21001-21004.
- WANG, N., ARAI, T., JI, Y., RINNINGER, F., TALL, A.R. (1998). Liver-specific overexpression of SR-BI decreases levels of VLDL lipoprotein apoB, LDL lipoprotein apoB, and HDL lipoprotein in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **273**: 32920-32926.
- WEISGRABER, K.H., MAHLEY, R.W., KOWAL, R.C., HERZ, J., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. (1990). Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* **265**: 22453-22459.
- WILLIAMS, D.L., CONNELLY, M.A., TEMEL, R.E., SWARNAKAR, S., PHILLIPS, M.C., DE LA LLERA-MOYA, M., ROTHBLAT, G.H. (1999). Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr. Opin. Lipidol.* **4**: 329-339.
- WOODFORD, J.K., BEHNKE, W.D. SCHROEDER, F. (1995). Liver fatty acid binding protein enhances sterol transfer by membrane interaction. *Mol. Cell. Biochem.* **152**: 51–62.

WOOLLETT, L.A., KEARNEY, D.M., SPADY, D.K. (1997). Diet modification alters plasma HDL cholesterol concentrations but not the transport of HDL cholesteryl esters to the liver in the hamster. *J. Lipid Res.* **38**: 2289-2302.

WOLFRUM, C., BUHLMAN, C., ROLF, B., BORCHERS, T., SPENER, F. (1999). Variation of liver fatty acid binding protein content in the human hepatoma cell line HepG2 by peroxisome proliferators and antisense RNA affects the rate of fatty acid uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **1437**: 194-201.

WOLFRUM, C., BORRMANN, C.M., BORCHERS, T., SPENER, F. (2001). Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha- and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 2323-2328.

YOSHIMURA, A., YOSHIDA, T., SEGUCHI, T., WAKI, M., ONO, M., KUWANO, M. (1987). Low binding capacity and altered O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptor in a monensin-resistant mutant of Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 13299-13308.

ZHONG, S., GOLDBERG, I.J., BRUCE, C., RUBIN, E., BRESLOW, J.L., TALL, A. (1994). Human ApoA-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **94**: 2457-2467.