

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DE LA VOIE DE CAPTATION SÉLECTIVE D'ESTER DE
CHOLESTÉROL SUR LE POTENTIEL D'OXYDATION ET LE
CATABOLISME DES LDL

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
PASCALE OUELLET

DÉCEMBRE 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 n°8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

En préambule, j'aimerais remercier ma directrice de recherche Louise Brissette sans qui cette recherche n'aurait pas été possible. Merci Louise pour ton support, ta grande patience, ton expertise, tes idées et ton temps.

J'aimerais aussi remercier Louise Martin-Falstrault. Grâce à Louise l'apprentissage des manipulations a été facilité au plus haut niveau et sa bonne humeur a ensoleillé toutes mes journées. Merci d'avoir été ma deuxième mère dans ce laboratoire.

Je tiens à remercier Vilay sans qui la portion expérimentale *in vivo* n'aurait pu être réalisée de même que Mathieu qui a permis de voir plus loin dans les résultats et les prochaines manipulations.

Je remercie aussi tout ceux et celles qui ont passé dans le laboratoire que ce soit Léo, To Quyen, Veneta, Mélanie, David et Félix pour tout ce qu'ils m'ont apporté comme connaissance que ce soit en chanson ou scientifique.

Je tiens aussi à souligner le support moral de mon conjoint Dominic et de mes parents sans qui je n'aurais probablement jamais terminé la rédaction de ce mémoire.

Une petite pensée spéciale va à mon grand père qui serait sans doute très fier de son unique petite fille!!!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I ÉTAT DES CONNAISSANCES	1
1.1 LES LIPIDES	1
1.2 LES APOLIPOPROTÉINES (apo).....	1
1.2.1 Les apo A	1
1.2.2 Les apo B	2
1.2.3 Les apo C	3
1.2.4 L'apo E	3
1.3 LES LIPOPROTÉINES	3
1.3.1 Les CM	4
1.3.2 Les VLDL	4
1.3.3 Les IDL.....	5
1.3.4 Les LDL.....	5
1.3.4.1 Les LDL1	5
1.3.4.2 Les LDL2	5
1.3.4.3 Les LDL3	6
1.3.5 Les HDL	6
1.4 L'OXYDATION DES LDL	7
1.5 LE MÉTABOLISME	10
1.5.1 La phospholipide lipase (LPL).....	10
1.5.2 La captation globale	11
1.5.3 La captation sélective	11
1.5.4 Les récepteurs participant au métabolisme des LDL	12
1.5.4.1 Le rLDL	12
1.5.4.2 Le CD36.....	13

1.5.4.3 Le SR-BI	14
1.6 BUT DU PROJET.....	17
1.7 HYPOTHÈSE.....	18
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	19
2.1-Matériel.....	19
2.1.1-Culture cellulaire (Hep G2).....	20
2.1.2-Les lipoprotéines.....	20
2.1.2.1-Isolement des LDL et HDL ₃	20
2.1.2.2-Isolement de sous-classes de LDL	21
2.1.2.3-Production de LDL légèrement oxydées (LOX) et de LDL fortement oxydées (FOX).....	21
2.1.2.4-Marquage des LDL.....	21
2.1.2.4.1-Marquage à l'iode radioactif.....	21
2.1.2.4.2-Marquage aux esters de cholestérol tritiés.....	22
2.2-Méthode	22
2.2.1-Production de LDL modifiées <i>in vitro</i>	22
2.2.1.1-Cellules Hep G2 adhérentes.....	22
2.2.1.2-Cellules Hep G2 en suspension.....	23
2.2.1.3 Vérification des niveaux de récepteur SR-BI	23
2.2.2-Production de LDL modifiées <i>in vivo</i>	24
2.2.3-Caractérisation physique et chimique des LDL.....	24
2.2.3.1-Analyse de la composition lipidique	24
2.2.3.2-Analyse de la grosseur des LDL	25
2.2.3.3-Analyse de la charge des particules	25
2.2.3.4-Analyse de la susceptibilité à l'oxydation.....	25
2.2.4-Métabolisme <i>in vivo</i>	26
2.2.5-Métabolisme <i>in vitro</i>	26
2.2.5.1-Association protéique	26
2.2.5.2-Association lipidique.....	27
2.2.5.3-Captation sélective	28
2.2.5.4-Dégradation.....	28

2.2.5.6-Compétition	28
2.2.6-Autres méthodes utilisées.....	29
CHAPITRE III RÉSULTATS.....	30
3.1 Les sous-classes de LDL	30
3.1.1 La composition en lipides des sous-classes.....	30
3.1.2 La taille et la charge des sous-classes	31
3.1.3 La susceptibilité à l'oxydation des sous-classes	32
3.1.4 Le métabolisme des sous-classes <i>in vivo</i>	32
3.1.5 Le métabolisme des sous-classes de LDL <i>in vitro</i>	33
3.2 Modification des LDL <i>in vitro</i>	36
3.2.1 Effet sur la composition en lipides de la modification effectuée <i>in vitro</i> par des cellules Hep G2.....	37
3.2.2 Effet de la mise en suspension des cellules sur l'expression du SR-BI38	
3.3 Modification des LDL <i>in vivo</i>	39
3.3.1 Chez le rat Sprague-Dawley	40
3.3.1.1 Métabolisme du rat Sprague-Dawley	40
3.3.1.2 Effet de la modification <i>in vivo</i> chez le rat Sprague Dawley sur la composition en lipides des LDL.....	41
3.3.1.3 Effet de la modification <i>in vivo</i> chez le rat Sprague Dawley sur la taille et la charge des LDL	42
3.3.1.4 Effet de la modification <i>in vivo</i> chez le rat Sprague Dawley sur la capacité de compétition des LDL par rapport aux LDL natives marquées sur la portion protéique.....	43
3.3.1.5 Effet de la modification <i>in vivo</i> chez le rat Sprague Dawley sur la capacité de compétition des LDL par rapport aux LDL natives marquées sur la portion lipidique.....	44
3.3.2 Chez les souris C57BL/6.....	45
3.3.2.1 Effet de la modification des LDL <i>in vivo</i> chez les souris C57BL/6 sur la composition lipidique des LDL	45
3.3.3 Chez les souris CD1	46
3.3.3.1 Métabolisme des LDL chez la souris CD1	46

3.3.3.2 Effet de la modification <i>in vivo</i> chez la souris CD1 sur la composition lipidique des LDL	47
3.3.3.3 Effet de la modification <i>in vivo</i> chez la souris CD1 sur la charge et la taille des LDL	48
3.3.3.4 Effet de la modification <i>in vivo</i> chez la souris CD1 sur la susceptibilité à l'oxydation des LDL	49
3.3.3.5 Effet de la modification <i>in vivo</i> chez la souris CD1 sur le métabolisme <i>in vitro</i> des LDL	50
3.3.3.6 Effet de la modification <i>in vivo</i> chez la souris CD1 sur la capacité de compétitionner des LDL par rapport à d'autres ligands du récepteur SR-BI	51
CHAPITRE IV DISCUSSION	53
4.1 Les sous-classes de LDL	53
4.2 Modèle <i>in vitro</i> chez les cellules Hep G2.....	55
4.3 Modèle <i>in vivo</i>	56
4.3.1 Chez le rat Sprague Dawley	56
4.3.2 Modèle <i>in vivo</i> chez la souris C57BL/6.....	59
4.3.3 Modèle <i>in vivo</i> chez la souris CD1	59
CONCLUSION	61
BIBLIOGRAPHIE	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Composition en cholestérol et triglycérides des sous-classes de LDL	31
Figure 2 : Évaluation de la charge et de la taille des différentes sous-classes de LDL.....	31
Figure 3 : Sensibilité à l'oxydation des différentes sous-classes de LDL.....	32
Figure 4 : Métabolisme des différentes sous-classes de LDL <i>in vivo</i> chez des souris C57BL/6.....	33
Figure 5 : Métabolisme des différentes sous-classes de LDL <i>in vitro</i> chez des cellules Hep G2.	35
Figure 6 : Métabolisme des sous-classes de LDL <i>in vitro</i> chez des cellules Hep G2 en présence de sous-classes de LDL compétitrices.....	36
Figure 7 : Effet d'une incubation avec des cellules Hep G2 adhérentes ou en suspension sur la composition lipidique des LDL.....	38
Figure 8 : Effet de la mise en suspension des cellules Hep G2 sur l'expression du récepteur SR-BI.....	39
Figure 9 : Métabolisme des LDL chez le rat Sprague Dawley	40
Figure 10 : Effet de la circulation des LDL dans le système sanguin du rat Sprague-Dawley sur leur compositions lipidiques, en fonction du temps.....	41
Figure 11 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin du rat Sprague-Dawley sur la composition lipidique de ces lipoprotéines.....	42
Figure 12 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin du rat Sprague-Dawley sur la charge et la taille de ces LDL.....	43
Figure 13 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin du rat Sprague-Dawley sur leurs capacités à compétitionner les LDL natives marquées sur leur portion protéique	44
Figure 14 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin du rat Sprague-Dawley sur leurs capacités à compétitionner les LDL natives marquées sur leur portion lipidique.....	45
Figure 15 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris C57BL/6 sur la composition lipidique de ces LDL.....	46

Figure 16 : Métabolisme des LDL chez la souris CD1	47
Figure 17 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris CD1 sur la composition lipidique de ces LDL.....	48
Figure 18 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris CD1 sur la charge et la taille de ces LDL	49
Figure 19 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris CD1 sur la susceptibilité à l'oxydation de ces LDL.....	50
Figure 20 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris CD1 sur le métabolisme <i>in vitro</i> de ces lipoprotéines	51
Figure 21 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris CD1 sur leur métabolisme <i>in vitro</i> en présence de différents ligands du SR-BI	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Apo	apolipoprotéine
Apobec1	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme</i>
BSA	<i>bovin serum albumin</i>
CETP	<i>cholesterol ester transfert protein</i>
CL	cholestérol libre
CLA-1	<i>CD36 LIMPII analogous-1</i>
CM	chylomicron
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CD68	<i>cluster of differentiation 68</i>
EC	ester de cholestérol
EDTA	éthylènediamine tétraacétate
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FOX	LDL fortement oxydées
<i>hCG</i>	<i>human chorionic gonadotrophin</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HMG CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
IDL	<i>intermediary density lipoprotein</i>
Insig	<i>insulin-induced gene</i>
KO	<i>knock-out</i>
LCAT	lécithine-cholestérol acyltransférase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLac	LDL acétylées
LDL-ox	LDL oxydées
LOX	LDL légèrement oxydées
LOX-1	<i>lectin like oxLDL receptor-1</i>
Lp (a)	lipoprotéine(a)
LPL	lipoprotéine lipase
LH	lipase hépatique

LRP	<i>LDL receptor-related protein</i>
M-BSA	BSA malonylée
MDA	malondialdéhyde
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MM-LDL	<i>minimally modified LDL</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinases</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
MOD	LDL modifiée
Ox-LDL	LDL fortement oxydées
PBS	solution de saline tamponnée en phosphate
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PMSG	<i>pregnant mare serum gonadotrophin</i>
PKC	protéine kinase C
PL	phospholipides
rLDL	récepteur de LDL
SCAP	<i>SREBP cleavage activating protein</i>
SDS-PAGE	gel de polyacrylamide contenant du sodium dodécyl sulfate
SF1	<i>steroidogenic factor 1</i>
SR-AI	<i>scavenger receptor class A type I</i>
SR-AII	<i>scavenger receptor class A type II</i>
SR-BI	<i>scavenger receptor class B type I</i>
SRE	<i>sterol regulatory element</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element binding protein</i>
TCA	acide trichloroacétique
TG	triglycérides
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>

RÉSUMÉ

Il est connu que la grosseur d'une lipoprotéine est déterminée par sa composition lipidique. Celle-ci peut être modifiée par la captation sélective d'esters de cholestérol (EC) par le *scavenger receptor class B type I* (SR-BI). Comme montré par Brodeur *et al.* (2005), la captation sélective permet de diminuer la taille de la lipoprotéine de faible densité (LDL). Il devenait donc important de déterminer si la perte d'esters de cholestérol, subséquente à la captation sélective par SR-BI, permettrait une modification assez importante de la LDL afin de favoriser le métabolisme de la lipoprotéine par la voie de captation globale. Les sous-classes de LDL ont une composition lipidique différente. Cette différence pourrait être produite par une activité plus ou moins grande de captation sélective par le SR-BI. Les sous-classes ont été caractérisées par dosage enzymatique, migration sur gel et essai *in vitro* sur la lignée cellulaire Hep G2. Par la suite, le but était de développer un modèle *in vitro*, chez des cellules Hep G2, et *in vivo*, chez des rats Sprague-Dawley, des souris CD1 et chez des souris C57BL/6, pour permettre la production de LDL étant appauvries en EC par la captation sélective. Pour ce faire, des LDL ont été exposées à des cellules Hep G2 ou encore injectées dans l'animal puis récupérées par ponction cardiaque pour ensuite être à nouveau isolées. Les LDL modifiées *in vivo* et *in vitro* ont été caractérisées par dosage enzymatique, migration sur gel et essai *in vitro* sur la lignée cellulaire Hep G2. L'étude des sous-classes a démontré qu'une diminution en EC permet une augmentation de la captation globale en augmentant l'association protéique et la dégradation de la sous-classe III. Ceci est bénéfique pour l'organisme. Pour ce qui est de la portion de l'étude *in vitro*, celle-ci n'a pas donné de résultats concluants. Cette production de LDL a permis de diminuer la quantité d'EC composant la LDL. Par contre, cette diminution est observable tant en présence qu'en absence de cellules Hep G2. Donc cette diminution n'est pas nécessairement due à l'action de la captation sélective. La production *in vivo* de LDL appauvries en EC chez le rat Sprague-Dawley a démontré une diminution de la quantité d'EC composant les lipoprotéines. Par contre, cette diminution s'accompagne d'une forte diminution en triglycérides (TG) due à l'activité de la lipoprotéine lipase qui est présente dans l'animal. La diminution en TG ne voulant pas être étudiée, ceci faisait du rat un modèle moins intéressant à utiliser. La souris CD1 a elle aussi permis la production de LDL appauvries en EC, par contre si l'on regarde au niveau de ses caractéristiques celles-ci sont plus chargées, ce qui pourrait indiquer un début d'oxydation et un métabolisme dont la captation globale serait diminuée et la captation sélective augmentée. Ainsi, en se fiant aux résultats des sous-classes, la captation sélective serait bénéfique pour le métabolisme des LDL. Par contre, les résultats obtenus par la production *in vivo* semblent dire que les LDL produites sont plus susceptibles à l'oxydation, ce qui serait néfaste.

Mots clés : LDL, SR-BI, captation sélective, oxydation, sous-classe

INTRODUCTION

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 LES LIPIDES

Les lipides sont des molécules essentielles à la vie. Ils se divisent en deux grandes catégories le cholestérol et les triglycérides. Le cholestérol est un précurseur des acides biliaires indispensables à la digestion des lipides, c'est aussi la molécule d'où dérivent les hormones stéroïdes. Il participe également à la structure des membranes des cellules. Il se retrouve sous la forme libre, cholestérol libre (CL) ou encore la fonction OH du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras qui rend la molécule totalement insoluble dans l'eau, cholestérol estérifié (EC). Les triglycérides jouent quant à eux un rôle important en fournissant l'énergie. Ils sont aussi stockés par des cellules spécialisées, les adipocytes, qui forment le tissu graisseux. Ces deux types de lipides ne sont pas solubles dans l'eau il circule dans le sang toujours au sein d'une protéine particulière appelée lipoprotéines.

1.2 LES APOLIPOPROTÉINES (apo)

Les apo jouent principalement un rôle dans le transport et la distribution des lipides aux différents tissus de l'organisme. Elles peuvent aussi agir comme cofacteur pour les enzymes du métabolisme lipidique (Havel *et al.* 1980) et participer dans le maintien de la structure des lipoprotéines (Mahley et Innerarity 1983).

1.2.1 Les apo A

Les apo A sont produites par le foie et les intestins (Zannis *et al.* 1980, Zannis *et al.* 1982). Elles existent sous trois formes : apo AI (28 kDa), apo AII (8,7 kDa) et

apo AIV (43,3 kDa) (Heller *et al.* 2005). L'expression de ces apo peut être régulée positivement par un repas riche en lipides au niveau des cellules intestinales (Mahley *et al.* 1984). Par contre, l'augmentation de lipides dans le sang ne semble pas influencer leur production au niveau du foie. L'apo AI a la capacité d'activer la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT) vu en détail dans la section 1.3.5 sur les HDL (Fielding *et al.* 1972, Mahley *et al.* 1984), une enzyme qui permet la transformation du CL et de l'acide gras de la lécithine en EC (Jonas 2000).

1.2.2 Les apo B

Les apo B sont connues pour leur rôle essentiel dans la formation des lipoprotéines riches en TG tels que les chylomicrons (CM) et les lipoprotéines de très faible densité (*very low density lipoprotein*, VLDL) (Hamilton *et al.* 1998). Les apo B existent sous deux formes : l'apo B-100 (549 kDa) qui est synthétisée par le foie et l'apo B-48 (264 kDa) dont la synthèse se fait au niveau des intestins (Cardin *et al.* 1986). L'apo B-48 est produite par la modification d'une base par l'*apolipoprotein B mRNA editing enzyme* (apobec1) sur l'ARNm de l'apo B-100 dans le noyau des cellules (Chan *et al.* 1997). La modification est faite sur le codon CAA qui code pour la glutamine 2153, celui-ci est modifié en UAA qui code pour un codon stop (Zhong *et al.* 2006). Ceci permet l'obtention d'une apo B plus courte que l'apo B-100 qui ne contient plus la portion qui se lie au récepteur de LDL (rLDL). Dans les intestins de la majorité des mammifères, l'ARNm de l'apo B se trouve entre 70 et 95% modifié pour produire de l'apo B-48. Par contre, au niveau du foie, les humains n'ont que des traces d'ARNm d'apo B-48 par rapport à 60 à 70% chez les rats et souris (Chan *et al.* 1997). L'apo B-48 est le constituant principal des chylomicrons tandis que l'apo B-100 est un constituant obligatoire des VLDL, des lipoprotéines de densité intermédiaire (*intermediary density lipoprotein*, IDL) et des lipoprotéines de faible densité (*low density lipoprotein*, LDL). Cette protéine augmente les risques d'athérosclérose en étant facilement modifiable par le clivage des protéases et l'oxydation (Chapman et Kane 1975, Margolis et Langdon 1966, Mahley *et al.* 1984, Innerarity *et al.* 1984).

1.2.3 Les apo C

Les apo C sont produites en grande partie par le foie et un peu moins par l'intestin (Krause *et al.* 1981, Wu et Windmueller 1979). Elles jouent un rôle d'activateur de la LCAT (Jonas *et al.* 1984.). Les apo C ont la capacité de se redistribuer vers des CM et des VLDL qui sont riches en TG. Trois types d'apo C sont connus : apo CI (6,6 kDa), CII (8,9 kDa) et CIII (8,7 kDa) (Heller *et al.* 2005). L'apo CII est un cofacteur enzymatique qui permet l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL) (Havel *et al.* 1970, LaRosa *et al.* 1970, Mahley *et al.* 1984) qui hydrolyse les TG. La LPL sera vue plus en détails un peu plus loin dans la section 1.5.1. Les TG deviennent alors des acides gras libres (Mahley *et al.* 1984). L'apo CIII est l'apo C la plus abondante (Nestel et Fidge 1982). Celle-ci nuit à la liaison des lipoprotéines aux rLDL et inhibe l'activité de la LCAT (Mahley *et al.* 1984).

1.2.4 L'apo E

L'apo E (34,2 kDa) est reconnue par le récepteur de LDL (rLDL) et le récepteur des chylomicrons, aussi connu sous le nom de *LDL receptor-related protein* (LRP) (Heller *et al.* 2005, Innerarity *et al.* 1984, Mahley *et al.* 1984). L'affinité de l'apo E à ses récepteurs est grande, ce qui permet un métabolisme plus rapide des lipoprotéines contenant cette protéine par rapport aux autres. De plus, cette protéine permet l'intégration d'un plus grand nombre de molécules d'EC dans la lipoprotéine en stabilisant l'enveloppe amphiphile, ce qui permet à la lipoprotéine d'incorporer plusieurs couches superposées d'EC au sein du cœur hydrophobe (Mahley *et al.* 1984).

1.3 LES LIPOPROTÉINES

Les lipoprotéines sont des macromolécules hydrophiles constituées d'apolipoprotéines et de lipides. Le cœur lipidique hydrophobe des lipoprotéines est constitué d'EC et de TG. Celui-ci 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.

Les lipoprotéines peuvent être classées soit par leurs grosseurs (Krauss et Burke 1982), densités, contenus en apolipoprotéines (Alaupovic 1991) ou encore suivant les trois critères réunis (Campos *et al.* 2001). Voici les cinq classes avec leurs noms les plus fréquemment utilisés : CM (d=0,93 g/mL), VLDL (d=1,006 g/mL), IDL (d=1,006-1,019 g/mL), LDL (d=1,019-1,063 g/mL) et les HDL (d=1,063-1,21 g/mL) (Mahley *et al.* 1984).

1.3.1 Les CM

Les CM assurent le transport de TG provenant de la diète. Ce sont les plus grosses lipoprotéines ayant une densité de 0,93 g/mL et un diamètre de plus de 100 nm (Mahley *et al.* 1984). Ces lipoprotéines sont synthétisées par l'intestin (Hamilton *et al.* 1998) et leur composition est de 86% de TG, 3% d'EC, 2% de CL, 7% de PL et 2% de protéines. Les CM contiennent des apo A, C, B-48 et E (Mahley *et al.* 1984). L'apo B-48 est nécessaire à la synthèse des CM (Hamilton *et al.* 1998, Malloy et Kane 1982).

1.3.2 Les VLDL

Les VLDL sont surtout chargées du transport endogène de TG mais peuvent aussi participer dans le transport des EC. Cette catégorie de lipoprotéine a une densité plus petite que 1,006 g/mL et un diamètre de 30 à 90 nm (Mahley *et al.* 1984). Elles sont constituées de 58% de TG, 8% d'EC, 6% de CL, 17% de PL et 11% de protéines (Berneis et Krauss 2002). La protéine la plus importante pour la fonctionnalité de cette lipoprotéine est l'apo B-100 mais des apo C et E sont aussi présentes (Björkegren *et al.* 1998, Mahley *et al.* 1984, Malloy et Kane 1982). Elles sont surtout produites par les hépatocytes (Hamilton *et al.* 1998) et peuvent être transformées en IDL par l'action de la LPL qui hydrolyse les TG en acides gras libres qui ne font plus partie de la lipoprotéine (Mahley *et al.* 1984). Cette perte de TG diminue la grosseur de la lipoprotéine, ce qui la rend plus dense.

1.3.3 Les IDL

Les IDL servent pour le transport des TG et des EC. Ces lipoprotéines sont créées par la modification des VLDL suite à l'action de la LPL qui provoque l'augmentation de la densité entre 1,006-1,019 g/mL (Mahley *et al.* 1984). Elles contiennent environ 16% de TG, 35% d'EC, 10% de CL, 21% de PL et 17% d'apo B-100 et E (Berneis et Krauss 2002). Les IDL peuvent, comme les VLDL, perdre des TG par l'hydrolyse effectuée par la LPL et par celle de la lipase hépatique et ainsi se transformer en LDL (Mahley *et al.* 1984).

1.3.4 Les LDL

Les LDL transportent surtout les EC et aussi des TG. Les LDL ont une densité située entre 1,019-1,063 g/mL et un diamètre entre 21 et 29 nm (Teng *et al.* 1983). Elles sont composées de 50% de CL et d'EC, 25% de protéines, 20% de PL et 5% de TG (Teng *et al.* 1983). La masse de protéines se compose à 95% d'apo B-100 (Campos *et al.* 1992). C'est cette apo B-100 qui est reconnue par le rLDL. Plus les LDL ont de TG et d'EC, plus elles ont du volume et moins elles sont denses. Ainsi, il est possible de diviser les LDL en plusieurs sous-groupes selon la composition en lipides tels que : les grosses nommées LDL1 (26,6-28,5 nm), les intermédiaires nommées LDL2 (25,6-26,5 nm) et les petites c'est-à-dire les LDL3 (22-25,5 nm de diamètre). On peut aussi classer les LDL en deux phénotypes : le A (plus de 25,5 nm) et le B (25,5 nm ou moins) (Hoefner *et al.* 2001). La plus commune des deux classifications est la première et sera celle utilisée ici.

1.3.4.1 Les LDL1

Les LDL1 sont composées de 7% de TG, 43% d'EC, 9% de CL, 22% de PL et 18% de protéines. Elles ont une densité variant entre 1.026 et 1.032 g/mL et un diamètre variant entre 272 et 285 Å (Berneis et Krauss 2002, Campos *et al.* 1996).

1.3.4.2 Les LDL2

Les LDL2 sont composées de 4% de TG, 45% d'EC, 10% de CL, 23% de PL et 19% de protéines. Elles ont une densité entre 1,032 et 1,038 g/mL et un diamètre

entre 256 et 272 Å (Berneis et Krauss 2002, Campos *et al.* 1996). Ce sont ces LDL qui ont le plus d'affinité pour le rLDL (Nigon *et al.* 1991).

1.3.4.3 Les LDL3

Les LDL3 sont composées de 3% de TG, 46% d'EC, 8% de CL, 21% de PL et 22% de protéines. Elles ont une densité de 1,038 et 1,050 g/mL, un diamètre entre 242 et 256 Å et représentent 65% de la totalité des LDL (Berneis et Krauss 2002, Campos *et al.* 1996). Elles sont plus facilement oxydées que les autres sous-classes de LDL (Tribble 1995, Tribble *et al.* 2001). L'oxydation des LDL, qui est expliquée avec plus de détail dans la section sur l'oxydation des lipoprotéines, a comme effet de diminuer l'affinité de la lipoprotéine pour le rLDL (Witztum et Steinberg 1991), ce qui diminue son catabolisme et augmente donc sa concentration dans la circulation sanguine (Alabakovska *et al.* 2004). Ayant moins d'affinité pour le rLDL, les LDL oxydées (LDL-ox) sont surtout éliminées de la circulation par les macrophages et les hépatocytes via des récepteurs éboueurs (*scavenger*) (Alabakovska *et al.* 2004). La captation de LDL par les macrophages est associée à la formation de plaques athérosclérotiques. Les personnes ayant une alimentation faible en gras ont donc tendance à avoir une majorité de LDL3 (Campos *et al.* 1992). La faible quantité de lipides à transporter permet aux LDL de contenir moins de TG et d'EC en leur cœur hydrophobe, ce qui fait d'elles des LDL plus petites et donc plus denses (Campos *et al.* 1992).

1.3.5 Les HDL

Les HDL sont en charge du transport des EC comme le font les LDL. Elles sont considérées comme des lipoprotéines anti-athérogéniques (Eisenberg 1984). Celles-ci, sous la forme native, proviennent du foie, des intestins et de la lipolyse intravasculaire des lipoprotéines riches en TG (CM et VLDL). Elles ont une densité variant entre 1,063-1,21 g/mL et un diamètre allant de 8 et 12 nm (Mahley *et al.* 1984). Les HDL natives sont constituées de phospholipides et d'apo AI. Celles-ci peuvent évoluer en HDL3 (3% de TG, 13% d'EC, 4% de CL, 25% de PL et 55% de protéines) puis en HDL2 (5% de TG, 17% d'EC, 5% de CL, 55% de

PL et 40% de protéines) en incorporant principalement des molécules de CL qui sont par la suite estérifiées par la LCAT (Mahley *et al.* 1984). Les HDL2 et 3 sont composées généralement d'apo AI, AII et C (Eisenberg 1984). L'action de la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) permet aux HDL2 d'échanger des EC contre des TG avec des lipoprotéines de plus faible densité (Guerin *et al.* 1994). Une fois les TG intégrés dans la HDL2, la LPL diminue la grosseur de la HDL en hydrolysant ces TG ce qui les élimine de la lipoprotéine. Il est ainsi possible pour la HDL2 de retourner au stade HDL3 (Eisenberg et Schurr 1976, Eisenberg *et al.* 1978).

1.4 L'OXYDATION DES LDL

Les cellules endothéliales (Parthasarathy *et al.* 1989) et les macrophages (Rankin *et al.* 1991) peuvent oxyder les LDL en produisant des lipides oxydés, connus sous le nom de lipoperoxydes, qu'elles vont transférer à la LDL par la suite (Witztum et Steinberg 1991). Il est aussi possible que les cellules de types musculaires lisses (Heinecke *et al.* 1987) sécrètent des anions superoxydes dans le milieu ce qui pourrait initier la peroxydation des lipides associés aux LDL (Cominacini *et al.* 2000, Li et Mehta 2000). Dès que la LDL commence à être oxydée, les agents oxydants continuent à produire des lipoperoxydes dans le cœur hydrophobe de la lipoprotéine et finalement réarrangent les doubles liaisons des acides gras. La phospholipase A2 associée aux LDL dans le plasma (Petrovic *et al.* 2001, Parthasarathy et Barnett 1990), permet la conversion de la lécithine en lysolécithine et la propagation de la peroxydation des lipides jusqu'à ce que les LDL soient entièrement oxydées (Steinberg *et al.* 1989). La propagation de la peroxydation des lipides cause la formation d'oxygène réactif qui oxyde la LDL et qui transforme les acides gras en aldéhydes et en cétones (Jurgens *et al.* 1987). Les principaux aldéhydes libérés sont des malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (Jurgens *et al.* 1986). Les aldéhydes ont la capacité de se lier à l'apo B-100 des LDL, plus précisément aux résidus lysine qui sont essentiels à la liaison aux rLDL (Haberland *et al.* 1982). Ainsi, plus l'oxydation s'intensifie, moins il y a de résidus lysine disponibles et moins il y a de liaison aux rLDL. Par

contre, la modification des résidus lysine de l'apo B-100 des LDL par les aldéhydes permet de générer l'épitope qui va être reconnu par les récepteurs *scavenger* des macrophages (Parthasarathy *et al.* 1987). Ainsi, une forte oxydation des LDL permet la captation par les macrophages via ces autres récepteurs.

L'oxydation *in vivo* peut être influencée par plusieurs facteurs tels que : la composition en acides gras des LDL, le contenu en antioxydants, l'activité de la phospholipase A2, la grosseur de la LDL, la disposition des composantes de la LDL, l'activité oxydante des cellules et la composition du plasma en composantes oxydantes et antioxydantes. Elle est aussi influencée par des facteurs agissant sur le temps durant lequel les LDL restent dans la tunique interne des artères tel qu'observé pour la lipoprotéine(a) (Lp (a)), une LDL de plus haute densité n'ayant pas d'affinité pour le rLDL puisque son apo B-100 est associée par une liaison disulfure à une molécule d'apo (a). Il en va de même pour les LDL d'individus diabétiques qui démontrent souvent une glycosylation non-enzymatique (Witztum et Steinberg 1991).

In vitro, les LDL peuvent être oxydées par des cellules endothéliales ou musculaires lisses en culture. En pratique, il est difficile de reproduire le même niveau d'oxydation entre les différentes expérimentations. Les différences peuvent provenir du type cellulaire utilisé pour initier l'oxydation, de la concentration des ions métalliques dans le milieu, de la composition du milieu de culture, des conditions d'incubation et de la différence de sensibilité à l'oxydation des préparations de LDL (Witztum et Steinberg 1991). Il est aussi possible d'oxyder des LDL *in vitro* à partir d'enzymes telle que la lipoxigénase qui, *in vivo*, produit le lipoperoxyde le plus impliqué dans le phénomène d'oxydation (Parthasarathy *et al.* 1989, Rankin *et al.* 1991). Cette méthode, basée sur la fiabilité de l'activité enzymatique, est peu utilisée, car il est plus reproductible d'utiliser l'ion cuivre pour obtenir des préparations de LDL oxydées à différents niveaux en modifiant soit le temps d'incubation ou la concentration de cuivre.

Le degré d'oxydation des LDL détermine l'effet sur les cellules. Elles peuvent être sous forme de LDL-ox ou *minimally modified* LDL (MM-LDL). Les MM-LDL activent la protéine kinase C (PKC) et la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) des cellules endothéliales. La PKC est une enzyme clé dans la régulation de l'expression des *matrix metalloproteinases* (MMP) et du collagène chez les cellules endothéliales (Li et Mehta 2005) tandis que les MAPK jouent un rôle crucial dans l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion des molécules, l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et l'apoptose (Li et Mehta 2000). Les LDL-ox favorisent l'activation du *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) chez les cellules endothéliales bovines (Cominacini *et al.* 2000). NF- κ B est un facteur qui contrôle, entre autres, la transcription des gènes de la phospholipase A2 et de la 5-lipoxygénase qui sont responsables de l'oxydation des LDL ; de la *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), une molécule pro-inflammatoire qui permet le recrutement des monocytes dans les parois des vaisseaux sanguins et cause la dysfonction des cellules endothéliales vasculaires (Berliner *et al.* 1990) (Li et Mehta 2000) ; de la *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) qui permet l'adhésion des cellules du système immunitaire aux cellules endothéliales vasculaires (De Winther *et al.* 2005). Ces gènes sont les acteurs principaux dans la formation de lésions athérosclérotiques. Les LDL-ox auraient aussi la capacité d'augmenter la concentration intracellulaire de radicaux libres.

Les LDL-ox sont reconnues par plusieurs récepteurs éboueurs tels que les *scavenger receptor class A type I* (SR-AI), *scavenger receptor class A type II* (SR-AII), *cluster of differentiation 36* (CD36), *scavenger receptor class B type I* (SR-BI) et *cluster of differentiation 68* (CD68) qui sont exprimés par les cellules musculaires lisses, les monocytes, les macrophages et les hépatocytes (Li et Mehta 2005). Chez les cellules endothéliales vasculaires, il y a le récepteur *lectin like oxLDL receptor-1* (LOX-1) qui permettrait aux LDL de traverser la paroi vasculaire endothéliale vers la région subendothéliale du réseau sanguin. En n'étant plus dans le plasma, les LDL ne sont plus protégées par les antioxydants et se trouvent donc exposées aux agents pro-oxydants (Sawamura *et al.* 1997).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer le pouvoir athérosclérotique des LDL-ox. Ainsi les LDL-ox sont captées par les macrophages qui sont incapables de les dégrader entièrement et donc accumulent les EC. Ces macrophages deviennent alors des cellules spumeuses. Les LDL-ox attirent les monocytes. Elles modifient l'expression génique des cellules environnantes et induisent le *methyl-accepting chemotaxis protein 1* (MCP-1) ainsi que les facteurs de croissance de colonie. Elles sont cytotoxiques pour les cellules environnantes. Elles inhibent la mobilité des macrophages tissulaires donc stimulent la réponse inflammatoire. Elles altèrent les voies de coagulation et les propriétés vasomotrices des artères coronariennes. Elles sont immunogènes et peuvent induire la formation d'anticorps (Witztum et Steinberg 1991).

1.5 LE MÉTABOLISME

1.5.1 La phospholipide lipase (LPL)

La LPL est une enzyme synthétisée et sécrétée par les adipocytes, les cellules musculaires, les cellules musculaires cardiaques et les macrophages (Deeb *et al.* 2003). Plusieurs lipases différentes peuvent être produites, dont la lipase hépatique (LH) qui est produite par les cellules hépatiques. Ces enzymes sont responsables de l'hydrolyse des TG composant les CM et les VLDL (Havel *et al.* 1973, Deeb *et al.* 2003). L'apo CII des CM serait responsable de l'activation de la LPL (Havel *et al.* 1973). Les acides gras libérés par l'hydrolyse sont utilisés comme source d'énergie pour les muscles ou comme réserve pour les adipocytes. Il est aussi possible que la LPL se lie aux récepteurs des lipoprotéines et aux lipoprotéines, ce qui faciliterait le processus d'association au récepteur et d'internalisation. Le métabolisme peut aussi être augmenté au niveau de la captation sélective effectuée par SR-BI (Seo *et al.* 2000). Il est par contre inhibé par la présence d'apo CI et d'apo CIII (Brown et Baginsky, 1972). Chez les rats, la lipase est exprimée au niveau hépatique à la naissance. En vieillissant, le foie cesse de produire la lipase. Celle-ci sera produite par le cœur, les muscles

squelettiques et les adipocytes. Par contre, chez la souris, la lipase est exprimée majoritairement sous forme de LH d'ailleurs une souris KO en LH meurt quelques jours après la naissance (Merkel *et al.* 1998).

1.5.2 La captation globale

La captation globale est un processus qui permet à la cellule d'entocyter d'une lipoprotéine. Elle est principalement effectuée par le rLDL mais peut aussi être effectuée par le CD36. Pour se faire, le rLDL, associé à un puits de clathrine, se lie à l'apolipoprotéine d'une lipoprotéine. Le complexe récepteur-lipoprotéine est ensuite internalisé. Si le besoin en cholestérol de la cellule n'est pas comblé, le rLDL est recyclé à la surface et la lipoprotéine est dégradée dans les lysosomes. Si le besoin en cholestérol est comblé, le récepteur est hydrolysé en acide aminé. L'apolipoprotéine est dégradée en acides aminés et les EC sont hydrolysés en CL et en acide gras.

1.5.3 La captation sélective

La captation sélective est la capacité d'une cellule, par l'entremise de récepteurs tels CD36 et SR-BI, de s'appropriier des EC en provenance de lipoprotéines sans que ces dernières soient entièrement dégradées. Les lipoprotéines se retrouvent donc en circulation dépourvues d'une fraction de leurs EC. Celle-ci a d'abord été mise en évidence pour les HDL, mais avec le temps, des études effectuées dans notre laboratoire ont montré que la captation sélective était aussi possible à partir des VLDL (Brissette *et al.* 1999), IDL (Brissette et Falstrault 1994), LDL natives (Brissette, Charest et Falstrault, 1996) et LDL-ox (Rhains et Brissette 1999). La captation sélective est un processus qui ne nécessite pas de dépense d'énergie (Pittman *et al.* 1987). La voie de captation sélective à partir des HDL a été la plus étudiée. Malheureusement, le processus exact n'est pas élucidé à ce jour. La captation sélective serait régulée principalement par la concentration en cholestérol libre dans la cellule (Knecht et Pittman 1989). Par contre, il semblerait que la vitesse du processus dépendrait de la grosseur de la particule. En effet, il serait plus facile d'effectuer de la captation sélective sur des petites lipoprotéines

que sur des grosses (Green et Pittman 1991). Dans le passé, il a été suggéré que les EC s'insèrent dans une invagination de 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, c'est-à-dire l'endocytose d'une lipoprotéine liée au SR-BI puis la libération des EC dans la cellule suivie de l'exocytose de la lipoprotéine appauvrie (Silver *et al.* 2001, Rhoads *et al.* 2004). D'autres études sont nécessaires pour éclaircir le phénomène.

1.5.4 Les récepteurs participant au métabolisme des LDL

1.5.4.1 Le rLDL

Le rLDL est une glycoprotéine monomérique de 160 kDa composée de 839 acides aminés (Schneider *et al.* 1982). Cette protéine se divise en cinq domaines : un domaine riche en cystéines qui permet la fixation du ligand, un domaine homologue au récepteur de l' *epidermal growth factor* (EGF), un domaine glycosylé, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Le site de fixation du ligand a une structure secondaire en hélice α . La conformation de ce domaine du récepteur permet d'exposer des sites riches en acides aminés chargés négativement au pH du sang. Ces charges négatives permettent aux charges positives des apolipoprotéines de s'associer au récepteur. Les domaines glycosylés et transmembranaires par leurs caractères respectifs, hydrophile et hydrophobe, permettent à la protéine d'être bien située par rapport à la membrane de la cellule. Ce récepteur se trouve à la surface de toutes les cellules et permet la reconnaissance des lipoprotéines contenant des apo B-100 ou E. L'affinité pour l'apo E est plus forte que pour l'apo B-100 étant donné sa présence nombreuse au sein d'une même lipoprotéine (Windler *et al.* 1980). L'expression du rLDL est régulée par la présence de cholestérol dans la cellule. En présence de cholestérol, la protéine *insulin-induced gene* (Insig) permet la rétention du complexe SREBP/SCAP (*sterol regulatory element binding protein/SREBP cleavage activating protein*) dans le réticulum endoplasmique. Quand le cholestérol diminue, il y a libération du complexe SREBP/SCAP, ce qui permet au complexe

de se diriger dans le golgi où il sera clivé à plusieurs endroits (Espenshade *et al.* 2002, Horton 2002, Yabe *al.* 2002). Le clivage permet l'obtention de la portion N-terminale active du SREBP qui, dans le noyau, permet la transcription des gènes contrôlés par le *sterol regulatory element* (SRE) (König *et al.* 2007). Ces gènes codent, entre autres, pour le rLDL et le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) réductase. Donc en absence de cholestérol, la cellule synthétise des ARNm qui sont ensuite traduits en protéine. Par contre, lorsqu'il y a une forte présence de cholestérol, ces ARNm ne peuvent être produits étant donné l'inactivité de SREBP, ce qui diminue l'expression du rLDL à la surface des cellules et inhibe la synthèse du cholestérol effectué par l'HMG CoA réductase (Saucier *et al.* 1989, Brown et Goldstein 1986, Russell *et al.* 1983, Brown et Goldstein 1975). L'hypercholestérolémie familiale est directement reliée à une anomalie au niveau du rLDL. Quatre causes existent dont l'absence de synthèse du rLDL, un problème au niveau de la maturation de la protéine, la diminution de la capacité à lier les lipoprotéines ou encore une diminution de l'internalisation du complexe récepteur-ligand (Brown et Goldstein 1975). Le rLDL est donc un récepteur des plus importants au niveau du métabolisme du cholestérol car une anomalie cause une augmentation des concentrations sériques de cholestérol qui augmentent les risques de formation de plaques athéromateuses et donc de maladies cardiovasculaires.

1.5.4.2 Le CD36

Le CD36 fait partie de la famille des « Scavenger receptor class B » tout comme le SR-BI (Krieger, 1997, Platt et Gordon, 1998). Ce récepteur est une protéine membranaire glycosylée de 88 kDa dont les extrémités N- et C- terminales sont ancrées dans la membrane de la cellule. On peut le retrouver sur les monocytes, les macrophages (Talle *et al.* 1983), les plaquettes (Li *et al.* 1993), les cellules endothéliales microvasculaires (Greenwalt *et al.* 1992), les cellules adipeuses (Abumrad *et al.* 1993) et les hépatocytes (Maeno *et al.* 1994). Le CD36 reconnaît certaines lipoprotéines telles que : VLDL, LDL, LDL-ox et HDL (Calvo *et al.* 1998, Nicholson *et al.* 1995). Les EC des HDL sont captés par ce récepteur via la

voie de captation sélective, par contre celle-ci est moins efficace que lorsque réalisée par le SR-BI (Connelly *et al.* 1999, Acton *et al.* 1996). L'action du récepteur CD36 peut être bénéfique et néfaste pour l'organisme. En effet, le CD36 permet la captation globale de LDL-ox et des LDL acétylées (LDLac), par contre ceci déclenche une réponse pro-inflammatoire chez les individus (Endemann *et al.* 1993). Il permet aussi la captation des acides gras (Febbraio et Silverstein, 2007). D'un autre côté, cette captation diminue la réponse de l'organisme à l'insuline. Il permet l'inhibition de l'angiogénèse ; ce qui est bien chez des personnes en santé mais qui est néfaste chez les gens souffrant d'hypercholestérolémie et de diabètes (Febbraio et Silverstein, 2007). Une déficience en CD36, cause une augmentation des niveaux de cholestérol plasmatique chez la souris (Febbraio *et al.* 1999). Si l'on ajoute une déficience en apo E à celle du CD36, il est possible d'observer une augmentation de 76% des lésions aortiques chez des souris nourries d'une diète riche en lipides (Febbraio *et al.* 2000).

1.5.4.3 Le SR-BI

Le SR-BI, une protéine d'un poids moléculaire de 85 kDa, est exprimé au niveau des cellules hépatiques et des cellules stéroïdogènes des rongeurs (Acton *et al.* 1996). Sa structure est un U inversé puisqu'il possède deux extrémités qui sont intracellulaires. L'équivalent humain de ce récepteur est le CLA-1 (Calvo et Vega 1993). Le SR-BI de cellules stéroïdogènes est situé dans les cavéoles, microdomaines de la membrane plasmique composés de cavéoline, une protéine, et riches en cholestérol et sphingomyéline (Babitt *et al.* 1997). Notre groupe a récemment démontré qu'au niveau de la cellule hépatique, il se situerait plutôt au niveau de radeaux lipidiques (Rhains *et al.* 2004, Truong *et al.* 2006) qui sont aussi riches en cholestérol et sphingomyéline mais dépourvues de cavéoline.

La régulation du gène de SR-BI diffère selon le type de tissu. Au niveau des cellules stéroïdogènes, l'expression de SR-BI est régulée à la hausse par les hormones *pregnant mare serum gonadotrophin* (PMSG) et *human chorionic*

gonadotrophin (hCG) (Mizutani *et al.* 1997). Chez la glande surrénale, la régulation se fait par l'intermédiaire de *steroidogenic factor 1* (SF1) (Cao *et al.* 1997). Dans le foie, la régulation semble être influencée par la quantité de cholestérol présente dans l'alimentation (Fluiter et Van Berkel, 1997). Il existe aussi une régulation post-transcriptionnelle qui nécessite la présence de la protéine PDZK1. Celle-ci est composée de quatre domaines PDZ dont le PDZ1 qui se lie directement à la portion C-terminale du récepteur SR-BI. La portion PDZ1 est essentielle, par contre elle n'est pas efficace seule. D'ailleurs la surexpression de PDZ1 chez des souris, il est possible d'observer une diminution de 75% de la présence du SR-BI hépatique dû à la compétition entre le PDZ1 et le PDZK1 (Fenske *et al.* 2008). La régulation effectuée par PDZK1 semble surtout se faire au foie et à l'intestin.

Le SR-BI est considéré comme étant le principal récepteur qui permet la captation sélective *in vitro* par les cellules hépatiques (Rhainds *et al.* 2003) et *in vivo* chez la souris (Brodeur *et al.* 2005). Ce récepteur a la capacité de reconnaître les LDLac, les LDL-ox, les LDL natives (Acton *et al.* 1994), les HDL (Acton *et al.* 1996) et les VLDL (Calvo *et al.* 1997). Ce récepteur se lie plus précisément aux apoA-I, A-II et CIII qui se trouvent dans le plasma ou dans les lipoprotéines (Xu *et al.* 1997). Le SR-BI occupe plusieurs fonctions dans le métabolisme du cholestérol. Il contrôle l'entrée sélective des molécules d'EC des HDL dans les hépatocytes et les cellules stéroïdogènes ; la formation de la bile au niveau du foie en permettant l'entrée de cholestérol dans les hépatocytes (Botham et Bravo 1995) et la sortie du cholestérol libre des cellules vers les HDL discoïdales qui mène à la diminution du cholestérol estérifié dans les cellules. Le SR-BI joue donc un rôle important dans le transport inverse du cholestérol des cellules vers le foie. Il contrôle aussi la concentration plasmatique des HDL, LDL et VLDL (Arai *et al.* 1999) et finalement il est impliqué dans l'absorption intestinale des lipides alimentaires (Hauser *et al.* 1998).

Plusieurs études ont démontré que l'activité du SR-BI influence sur le cholestérol circulant dans les organismes. Une diminution de l'expression du récepteur mène à une augmentation des niveaux de cholestérol sanguin. Ainsi chez les souris *knock-out* (KO) en SR-BI, on observe une augmentation des niveaux de cholestérol de 125% accompagnée d'une augmentation de la taille des HDL (Rigotti *et al.* 1997). Si l'expression du récepteur SR-BI diminue de 50%, une augmentation de la quantité de HDL circulante est aussi détectée (Varban *et al.* 1998). De la même manière, chez des souris PDZK1 KO qui ont, comparé à des souris normales, des niveaux de 5% de SR-BI au foie et de 50% dans l'intestin proximal, une augmentation de 70% du cholestérol plasmatique est observée. De plus les HDL sont anormalement grosses (Fenske *et al.* 2008). L'avantage de ces souris est que l'expression du SR-BI dans les organes stéroïdes n'est pas affectée ce qui permet aux femelles d'être fertile. Les souris SR-BI KO, elles sont infertiles (Fenske *et al.* 2008).

À l'opposé, une surexpression du SR-BI au niveau du foie s'accompagne d'une diminution des concentrations plasmatiques de HDL, VLDL et LDL (Kozarsky *et al.* 1997). De plus cette modification confère aux souris une plus grande résistance face à l'augmentation en apoB causée par une alimentation riche en gras et en cholestérol (Wang *et al.* 1998). Une surexpression plus marquée du SR-BI (10 à 40 fois) chez des souris déficientes en rLDL, s'accompagne de la même modification au niveau des concentrations en lipoprotéines (Arai *et al.* 1999).

Les niveaux élevés de cholestérol dans le plasma sont un facteur influençant le développement de l'athérosclérose dans les artères coronariennes menant aux infarctus du myocarde et parfois même à la mort prématurée. Plusieurs modèles murins, tels les souris déficientes en rLDL et en apoE, sont connus pour leurs augmentations en cholestérol et l'apparition de plaques athérosclérotiques. Par contre, ces modèles ne démontrent pas d'infarctus du myocarde, ni de morts prématurées. Afin de mieux étudier le développement des maladies coronariennes suite à l'apparition de l'athérosclérose, l'équipe de Braun *et al.* (2002 et 2003) ont

réussi à développer un modèle murin doublement déficient en SR-BI et en apoE. Quatre à cinq semaines après leurs naissances, les souris développent des lésions d'athérosclérose dans le sinus aortique et ne vivent pas plus de huit semaines. Une autre équipe a tenté de recréer ce modèle en inhibant le SR-BI en développant une souris PDZK1 KO. Le double KO PDZK1/apoE a causé le développement de plaques d'athérosclérose mais n'a pas causé de développement de maladies coronariennes majeures telles qu'observées avec le modèle double KO SR-BI/apoE. La différence entre les deux modèles se situe au niveau de l'expression des récepteurs. Dans le cas du SR-BI KO, tous les récepteurs de tous les tissus sont touchés tandis que dans le cas du PDZK1 KO, les niveaux de récepteur SR-BI sont atténués spécifiquement au niveau hépatique et intestinal (Kocher *et al.* 2008). Chez des souris KO en rLDL qui démontrent des lésions athérosclérotiques, la surexpression de SR-BI, grâce à l'injection d'un adénovirus recombinant contenant le gène de SR-BI murin, diminue le taux d'athérosclérose (Kozarsky *et al.* 2000). La surexpression du SR-BI chez les souris rLDL KO diminue l'apparition des lésions athéromateuses de 70% par rapport à des souris déficiente en rLDL (Arai *et al.* 1999).

1.6 BUT DU PROJET

Le but du projet est d'évaluer l'impact de la captation sélective des LDL par le récepteur SR-BI sur leur caractéristique physique et leur métabolisme. Il est possible d'affirmer que l'activité du SR-BI a une influence positive sur le métabolisme du cholestérol dans l'organisme entier. En effet, son absence est néfaste pour les animaux en augmentant les taux de cholestérol et la combinaison avec une déficience en apoE devient mortelle (Braun *et al.* 2002, Braun *et al.* 2003). Dans le cas d'une surexpression, il est possible d'observer une diminution des concentrations de cholestérol sanguin accompagnée d'une diminution de l'apparition des lésions athérosclérotique (Arai *et al.* 1999). De plus, chez des souris déficientes en rLDL, la surexpression de SR-BI permet la disparition graduelle des lésions (Kozarsky *et al.* 2000). L'action bénéfique du SR-BI est donc confirmée par plusieurs études, par contre l'impact précis sur la LDL elle-

même reste inconnu. Il est donc intéressant de vérifier quel est l'effet de cette perte en EC sur le métabolisme et la susceptibilité à l'oxydation de la lipoprotéine. La première façon de vérifier l'impact de l'action du SR-BI est de caractériser les sous-classes de LDL qui sont potentiellement produites par la captation sélective. Il devenait aussi important de développer un modèle *in vitro* ou *in vivo* afin de recréer ces sous-classes de LDL.

1.7 HYPOTHÈSE

La première hypothèse de cette étude est que l'hétérogénéité des LDL serait due à une activité plus ou moins grande de captation sélective par le SR-BI. En effet, la captation sélective effectuée par intermédiaire de ce récepteur permet de diminuer la quantité d'EC composant la lipoprotéine. Ainsi la LDL se lie au récepteur, le complexe est internaliser, la LDL subie une déplétion en EC pour ensuite être relâchée dans la circulation sanguine. Une fois de retour dans la circulation sanguine, rien n'empêche la LDL d'interagir à nouveau avec le SR-BI et subir à nouveau la captation sélective. Ainsi, suite à la captation sélective la lipoprotéine devient plus petite et le nombre de fois que la LDL subie la captation sélective fera varier encore plus la taille et la composition de la LDL, ce qui pourrait être la source de la formation des sous-classes de LDL.

Comme vu précédemment, l'action du SR-BI est bénéfique pour le métabolisme du cholestérol en général. La deuxième hypothèse de cette étude est que la diminution en EC suite à la captation sélective chez les LDL diminue la taille de la LDL et augmente ainsi son métabolisme par le rLDL. En effet, selon la théorie, la sous-classe II est celle qui a le plus d'affinité pour le rLDL, par contre la population en général aurait une plus grande proportion de LDL de sous-classe I. Ainsi la captation sélective pourrait transformer les sous-classes I en II et ainsi favoriser le métabolisme par le rLDL. Seul bémol à cette hypothèse est qu'une surexpression du SR-BI est bénéfique chez des souris déficientes en rLDL et donc que le rLDL n'est pas impliqué dans ce cas précis. Il y a probablement d'autres voies qui sont impliquées.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La première partie de l'expérimentation porte sur l'isolement de 3 sous-classes de LDL à partir de plasma humain suivi de l'évaluation de la composition en lipides, du poids moléculaire et de la charge. Le potentiel des sous-classes à se lier à la cellule hépatique Hep G2 et à être dégradées via le rLDL est aussi évalué. De plus, la sensibilité à l'oxydation des sous-classes est évaluée par un essai mesurant la vitesse d'oxydation par un agent oxydant.

La seconde partie de l'expérimentation débute avec l'isolement des lipoprotéines par centrifugations différentielles de plasma humain. Les LDL ainsi isolées sont modifiées par la captation sélective d'EC *in vitro*, par des cellules Hep G2, ou *in vivo* par injection dans le système circulatoire de rats ou de souris CD1 ou C57BL/6. Ces LDL modifiées (Mod) sont réisolées. Différents tests sont effectués sur les LDL modifiées et sur les LDL natives afin de déterminer la composition en lipides, le poids moléculaire, la charge et le statut oxydatif des LDL nouvellement obtenues. La facilité de ces LDL modifiées à se lier à la cellule hépatique et à être dégradées via le rLDL est aussi évaluée. De plus, la sensibilité à l'oxydation des LDL natives et des LDL appauvries en EC est évaluée par un essai mesurant la vitesse d'oxydation par un agent oxydant. Les LDL natives sont des LDL du même lot que les LDL utilisées pour la modification *in vivo* ou *in vitro*.

2.1-Matériel

La lignée cellulaire d'hépatome humain, Hep G2, est obtenue de *American Type Culture Collection* (Rockville, Maryland). Le milieu essentiel minimal (MEM), le

sérum de veau foetal, la pénicilline-streptomycine utilisés pour la culture cellulaire sont achetés chez Life Technologies Gibco BRL (Burlington, Ontario). L'iode-125 (^{125}I) (100 mCi/mmol) et le 1,2- ^3H -cholestérol oléate (50 mCi/mmol) sont acquis respectivement d'ICN Canada (Montréal, Québec) et d'Amersham Pharmacia Biotech (Laval, Québec).

2.1.1-Culture cellulaire (Hep G2)

Les cellules Hep G2 sont maintenues en culture dans des flacons de 75 cm² contenant 15 mL de milieu de culture MEM enrichi avec du sérum fœtal bovin (10 %), de la pénicilline (100 U/mL), de la streptomycine (100 mg/mL) et de la glutamine (4 mM). Pendant la croissance cellulaire, les cellules sont conservées à une température de 37 °C dont l'air est saturé en H₂O et contient 5 % de CO₂. Pour effectuer la modification des LDL *in vitro*, les cellules sont mises en croissance dans des flacons de 225 cm². Préalablement aux études de métabolisme *in vitro* les cellules sont mises en croissance dans des plats de culture de 3,8 cm² (plaques de 12 puits). Le milieu de culture est changé aux deux jours et les cellules sont soumises à une sous culture toutes les semaines.

2.1.2-Les lipoprotéines

2.1.2.1-Isolement des LDL et HDL₃

Les lipoprotéines sont isolées du sérum humain par centrifugations différentielles, tel que décrit par Hatch et Lees (1968). On ajoute dans le sérum : 10 µM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) pour inhiber les protéases, 0,01 % de tétracétate d'éthylènediamine (EDTA) pour la chélation des métaux et 0,02 % d'azoture de sodium (NaN₃) pour inhiber le développement bactérien. Le NaBr, en poudre, est utilisé afin d'augmenter la densité des solutions. Une centrifugation de 30 minutes à 2 000 g du plasma permet la flottaison des chylomicrons. Le sous-nageant obtenu est centrifugé à 1 800 000 g X h. La densité du nouveau sous-nageant est augmentée à 1,025 g/mL par l'ajout de NaBr puis est centrifugé à 2 300 000 g X h. La densité est à nouveau augmentée pour atteindre 1,063 g/mL.

puis la solution de lipoprotéine est recentrifugée à 2 300 000 g X h. La densité du sous-nageant obtenu est augmentée à une densité de 1,125 g/mL et la solution est centrifugée cette fois à 3 000 000 g X h. Ce dernier sous-nageant subit un ajout de NaBr afin d'augmenter sa densité à 1,21 g/mL pour être finalement centrifugé à 4 600 000 g X h. Les LDL humaines ($d = 1,025-1,063$ g/mL) et les HDL₃ ($d = 1,125-1,21$ g/mL) sont récupérées par ultracentrifugation tel que décrit par Brissette *et al.* (1986) et dialysées dans une solution physiologique (NaCl à 150 mM, ajustée à pH 7,5). Une fois obtenues, les lipoprotéines sont quantifiées par le dosage de Lowry.

2.1.2.2-Isolement de sous-classes de LDL

L'isolement des sous-classes se fait de la même manière que l'isolement des LDL à partir du plasma humain à la différence qu'elles sont obtenues grâce à des tranches plus petites de densités. La sous-classe I a une densité de 1,020 à 1,034 g/mL, la II de 1,035 à 1,045 g/mL et la III de 1,046 à 1,063 g/mL (Campos *et al.* 1996).

2.1.2.3-Production de LDL légèrement oxydées (LOX) et de LDL fortement oxydées (FOX)

Les LOX sont produites en incubant des LDL (200 µg/mL) avec 5 µM de CuSO₄ à 37°C pendant 4h. Pour générer les FOX, les LDL sont incubées dans les mêmes conditions mais pendant 20 h (Lougheed et Steinbrecher, 1996).

2.1.2.4-Marquage des LDL

2.1.2.4.1-Marquage à l'iode radioactif

Les LDL natives ainsi que les LDL appauvries en EC sont marquées sur la portion protéique avec de l'iode radioactif grâce à la technique de McFarlane (1948) modifiée par Langer *et al.* (1972). Ainsi pour marquer 2,5 mg de lipoprotéines, un millicurie de Na¹²⁵I, 30 nmoles de monochlorure d'iode et 0,5 M de glycine-NaOH à pH 10 sont utilisés. On élimine ensuite l'iode libre de la solution de lipoprotéines par une filtration sur gel de Sephadex G-25. Suite à ceci les

lipoprotéines sont dialysées dans une solution de saline tamponnée au Tris jusqu'à l'obtention d'une densité physiologique. L'activité spécifique de ces lipoprotéines se situe normalement entre 100 000 et 250 000 cpm/ μ g de protéine. Une fois marquées, la concentration en lipoprotéines est déterminée puis l'activité spécifique est obtenue par la lecture de radioactivité de différentes masses de protéines sur le compteur gamma (Cobra II counter de Canberra-Packard).

2.1.2.4.2-Marquage aux esters de cholestérol tritiés

Les LDL sont marquées grâce à la technique mise au point par Roberts *et al.* (1985). La solution d'esters de cholestérol tritiés (25 microcuries) est évaporée sous un jet d'azote pour ensuite être dissoute dans 250 μ L d'acétone. Cette solution, contenant les EC tritiés, est ajoutée très lentement à 3 mL de sérum dépourvu en lipoprotéines (ce sérum qui contient la CETP nécessaire au marquage est obtenu préalablement par le retrait complet des lipoprotéines par ultracentrifugation). Le tout est conservé à la température de la pièce et l'acétone est évaporée grâce à un jet d'azote. Un mg de lipoprotéines (1 mg/mL) est ajouté et le tout est incubé pendant 30 minutes à 4 °C. Suite à l'incubation, les LDL sont ré-isolées par ultracentrifugation. L'activité spécifique de ces lipoprotéines marquées est généralement d'environ 10 000 cpm/ μ g de protéine. Une fois marquées, la concentration en lipoprotéines est déterminée puis l'activité spécifique est obtenue par la lecture de radioactivité de différentes masses de protéines sur le compteur beta (Wallach-Fischer).

2.2-Méthode

2.2.1-Production de LDL modifiées *in vitro*

2.2.1.1-Cellules Hep G2 adhérentes

La captation sélective est effectuée sur des cellules Hep G2 confluentes à 90 % dans des flacons de culture de 225 cm² afin de générer des LDL appauvries en EC. Les cellules sont préalablement lavées avec une solution saline tamponnée en phosphate (PBS). Ces cellules sont incubées en présence de LDL [300 μ g de

protéines/mL] qui se trouvent dans du milieu MEM contenant de la *bovin serum albumin* (BSA) (4 %) à 37°C pendant 6 h. Suite à l'incubation, le milieu est prélevé, est ajusté à une densité de 1,070 g/mL avec du NaBr et est centrifugé pour isoler les LDL (Brissette *et al.* 1986). Un témoin est fait dans les mêmes conditions mais en utilisant des plats de culture ne contenant pas de cellules. Afin de s'assurer que les conditions de l'expérimentation sont uniformes dans les répliques, les protéines des cellules sont extraites avec 0,1 N de NaOH et sont dosées.

2.2.1.2-Cellules Hep G2 en suspension

La captation sélective est effectuée sur des cellules Hep G2 en suspension. Les cellules Hep G2 sont obtenues suite à l'action de la trypsine [0,025%] sur le contenu cellulaire d'un flacon de culture de 225 cm² dont la confluence atteint 90 %. La suspension de cellule est centrifugée 5 minutes à 300 g pour éliminer le surnageant et permettre aux cellules d'être en suspension dans un milieu frais de MEM contenant de la BSA (4 %). Ces cellules sont incubées en présence de LDL [300 µg de protéines/mL] à 37°C pendant 6 h avec une agitation rotative. Trois contenants différents sont comparés pour effectuer l'incubation soit : un tube kimpex en verre d'un volume approximatif de 15 mL, un tube Sarsteadt de 15 mL et un de 50 mL. Le milieu est oxygéné à toutes les heures. Suite à l'incubation, une centrifugation permet la séparation des cellules du milieu. La densité du milieu est augmentée à 1,063 g/mL par l'ajout de NaBr afin de permettre l'isolement des LDL par ultracentrifugation (Brissette *et al.* 1986). Un témoin est fait dans les mêmes conditions mais en absence de cellules. Afin de s'assurer que les conditions de l'expérimentation sont uniformes, les protéines des cellules, qui ont été récupérées plus tôt par centrifugation, sont extraites avec 0,1 N de NaOH et sont dosées.

2.2.1.3 Vérification des niveaux de récepteur SR-BI

Les protéines totales des cellules Hep G2 mises en solution et les cellules Hep G2 adhérentes sont extraites dans la solution de solubilisation (125 mM Tris-HCl à

pH 8,0 contenant 0,2 mM de CaCl₂, 1,4 % de triton X-100, 1 mM de PMSF, 1 μM de leupeptin, 10 mg/mL d'aprotinine et 200 μM de pepstatine). Cinquante μg de protéines sont séparés sur gel de polyacrylamide contenant du sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) à 10% (Yoshimura *et al.* 1987). Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et sont détectées avec un anticorps polyclonal anti-SR-BI (1 :5000) (pAb anti-SR-BI NB 400101) suivi par une exposition à un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (1 :5000). Finalement la membrane est révélée par chemiluminescence sur un film Kodak Biomax ML.

2.2.2.2-Production de LDL modifiées *in vivo*

Un volume de 150 μL contenant différentes quantités de LDL, déterminées en fonction du poids des animaux et ayant comme référence 1 mg chez les souris C57BL/6 (Brodeur *et al.* 2005) 12 mg par rat, 1,5 mg par souris CD1 ou 1 mg par souris C57BL/6 sont injectées par la veine de la queue dans les animaux. Dans certain cas, la LPL est inhibée par une injection dans l'animal de protamine sulfate (25 mg/kg) 30 minutes avant les LDL (Ugawa *et al.* 2003). Une, trois ou six heures suite à l'injection des lipoprotéines, le sang des animaux est récupéré par une ponction dans la veine cave postérieure. Par la suite, les LDL sont isolées par ultracentrifugation. Pour effectuer un contrôle, le sang d'un l'animal est récupéré pour être centrifugé. Le plasma est récupéré et des LDL sont ajoutées. La solution est conservée 3 heures à 37°C pour simuler la température des animaux. Le contrôle permet de vérifier l'impact des protéines du plasma sur les LDL.

2.2.3-Caractérisation physique et chimique des LDL

2.2.3.1-Analyse de la composition lipidique

La composition en cholestérol libre et en ester de cholestérol des LDL est déterminée par le protocole enzymatique de Deacon et Dawson (1979). Des tests enzymatiques, disponibles chez Boehringer Mannheim, permettent le dosage des phospholipides et triglycérides (De Roos *et al.* 2005).

2.2.3.2-Analyse de la grosseur des LDL

La grosseur des LDL est évaluée par électrophorèse sur gradient, dans des conditions non dénaturantes, (*non denaturing gradient gel electrophoresis* (NDGGE)) (Krauss et Burke, 1982). La migration se fait sur un gel en gradient de polyacrylamide de 2-16%. Le chargement d'un volume total de 20 μL , contient 5 μg de LDL dans 5 μL de tampon de chargement Tris-Borate-EDTA (TBE) (0,09 M Tris, 0,08 M borate et 3mM EDTA, pH 8,3) contenant 40% de sucrose et une pincée de bleu de bromophénol qui permet de suivre le front de migration. Un standard de haut poids moléculaire (Amersham Bioscience) est utilisé comme échelle de poids moléculaire. La migration est effectuée à 4°C dans un tampon TBE à un voltage de 15 V pour 15 minutes, 70 V pour 20 minutes, puis 24 heures à 125 V. La révélation du gel se fait par coloration dans une solution de bleu de Coomassie R250 (BioRad) et une décoloration dans une solution de 20% en méthanol et 10 % en acide acétique.

2.2.3.3-Analyse de la charge des particules

L'analyse de la charge des particules est effectuée par électrophorèse sur gel de barbital-agarose à 0,5 %. Le chargement, d'un volume total de 15 μL , contient 5 μg de LDL dans 5 μL de tampon de chargement contenant 25% de glycérol, 75% barbital [1X] et une pincée de bleu de bromophénol. La migration est effectuée pendant 1h30 à 90 V dans un tampon de barbital [1X] conçu à partir de la solution concentrée fournie par la compagnie (Sigma). La révélation du gel se fait par une coloration dans une solution de bleu de Coomassie R250, disponible chez BioRad, suivie d'une décoloration dans une solution de 10% en méthanol et de 10% en acide acétique.

2.2.3.4-Analyse de la susceptibilité à l'oxydation

L'oxydation des LDL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du PBS) est débutée par l'ajout de 1,6 μM de CuSO_4 . Afin de déterminer le taux d'oxydation, l'apparition de diènes conjugués est mesurée aux 4 minutes par spectrophotométrie à 234 nm tout au

long de la période d'exposition de 5 heures. Ceci permet d'obtenir une courbe illustrant l'oxydation en fonction du temps (Maggi *et al.* 1994).

2.2.4-Métabolisme *in vivo*

Le métabolisme *in vivo* consiste en l'évaluation de la clairance des lipoprotéines chez l'animal. Tel que décrit dans Brodeur *et al.* (2005), des rats et des souris, CD1 ou C57BL/6, sont injectées par la veine de la queue avec un bolus de LDL humaines contenant 450 µg de lipoprotéines non-marquées et 50 µg de lipoprotéines marquées soit à l'¹²⁵I soit au ³H-CE dans un volume total de 150 µL de saline. Le bolus permet une clairance plus lente des lipoprotéines radiomarquées. Grâce à des microvettes pré-héparinées, des prises de sang sont effectuées dans la veine saphène à 2, 5, 10, 20, 30, 60, 180, 360 et 1440 minutes suite à l'injection. Les échantillons recueillis sont centrifugés à 10 000 g pour 5 minutes à 4°C. La radioactivité du plasma récupéré est directement comptée pour le ³H à l'aide du compteur bêta (Wallach-Fischer) tandis que la radioactivité de l'¹²⁵I est déterminée dans la fraction précipitée par l'acide trichloroacétique (TCA) à 30% afin d'éliminer l'impact des peptides radioactifs rejetés par les cellules suite à la dégradation des LDL par la voie du rLDL. En effet, un niveau de dégradation important ferait que le niveau de ¹²⁵I-LDL demeurant dans le sang serait surestimé.

2.2.5-Métabolisme *in vitro*

2.2.5.1-Association protéique

L'association protéique des LDL correspond à : la portion internalisée dans la cellule et la portion liée aux récepteurs à la surface cellulaire (rLDL et SR-BI). Des cellules Hep G2 confluentes à 90% sont tout d'abord lavées à deux reprises avec du PBS. Les cellules sont incubées pendant 4 h à 37°C avec 50 µg/mL de lipoprotéines marquées à l'¹²⁵I dans un volume final de 250 µL contenant 125 µL de MEM [2x concentré] et 4% de BSA à un pH de 7,4 (association totale). L'association non-spécifique est déterminée par l'addition de LDL non marquées

radioactivement [1,5 mg de protéines/mL]. Suite à l'incubation, le milieu est récupéré et les cellules sont lavées avec 250 μ L de PBS contenant 0,2% de BSA et le tout est conservé pour effectuer le protocole visant à quantifier la dégradation vue un peu plus loin. Deux autres lavages sont effectués avec du PBS. Les cellules sont ensuite solubilisées dans 1,5 mL de NaOH à 0,1 M. La radioactivité des cellules solubilisées est mesurée avec un compteur gamma (Cobra II counter de Canberra-Packard). Les protéines cellulaires des échantillons sont ensuite dosées.

Les lectures de radioactivité donnent 2 données (en cpm) : l'association non-spécifique qui correspond aux puits contenant les LDL marquées et non-marquées et l'association totale qui correspond aux puits ne contenant que des LDL marquées. Afin d'obtenir l'association spécifique, il faut soustraire la valeur d'association non-spécifique de celle de l'association totale. Cette valeur est ensuite divisée par celle de l'activité spécifique (radioactivité (cpm)/quantité de protéine de LDL (μ g)). Le résultat de cette opération donne la quantité de LDL associées aux cellules Hep G2 en μ g. Cette dernière donnée est ensuite divisée par la quantité de protéine cellulaire en mg. Ceci nous permet d'établir la quantité de LDL liées (μ g) par mg de protéines cellulaires. Il est aussi possible d'évaluer uniquement l'association via le rLDL chez les cellules Hep G2, en ajoutant aux milieux d'essai 1,5 mg/mL de HDL₃ afin de saturer les récepteurs de SR-BI tel que décrit par Brissette *et al.* (1996).

2.2.5.2-Association lipidique

L'essai d'association lipidique illustre la portion internalisée dans la cellule, la portion de captation sélective et la portion liée aux récepteurs à la surface cellulaire (rLDL et SR-BI). L'association lipidique est effectuée de la même manière que celui de l'association protéique excepté que celui-ci se fait avec des lipoprotéines marquées aux ³H-EC et que la radioactivité des cellules solubilisées est obtenue par la lecture au compteur beta (Wallach-Fischer). Le calcul reste le même que précédemment.

2.2.5.3-Captation sélective

La captation sélective du EC est obtenue par le calcul de la soustraction de la valeur de l'association protéique de celle de l'association lipidique. Une valeur plus grande que zéro indique que cette voie est fonctionnelle (Rhainds *et al.* 1999).

2.2.5.4-Dégradation

La dégradation représente la portion de LDL qui a été dégradée par la voie de captation globale (rLDL) de la cellule. Comme mentionné précédemment, le milieu d'incubation et le milieu obtenu après le lavage des cellules avec 250 μ L de PBS contenant 0,2% de BSA est conservé. De la BSA et du acide trichloroacétique (TCA) sont ajoutés à une concentration finale respective de 1% et 12%, et le tout est mélangé grâce à un vortex pour permettre la précipitation des protéines. La solution est ensuite incubée pendant un minimum de 30 minutes à 4°C pour ensuite être centrifugée pour 15 minutes à 4 500 rpm. Le surnageant est récupéré, du KI et du H₂O₂ sont ajoutés à des concentrations finales de 0,4% et 1,2% respectivement. Le tout est incubé pendant 5 minutes à la température de la pièce. La phase aqueuse est extraite dans 2 mL de chloroforme et comptée au compteur gamma. La radioactivité est mesurée dans la phase aqueuse qui contient les petits peptides d'apoB radioactifs rejetés par la cellule suite à la dégradation. Le calcul reste le même que pour celui de l'association.

2.2.5.6-Compétition

L'essai de compétition permet de déterminer l'affinité des différentes lipoprotéines pour les récepteurs. La méthode ressemble beaucoup à celle des essais d'association protéique et lipidique. Elle consiste à exposer des cellules à des lipoprotéines marquées soit à l'¹²⁵I ou au ³H-EC pendant 2 ou 4 heures respectivement, en présence de lipoprotéines compétitrices non marquées (ex : LDL, Mod, LOX, FOX ou HDL) à différentes concentrations soient celles de 200, 400, 800 μ g/mL et 1 500 μ g/mL (Rhainds *et al.* 1999). Suite à l'incubation, le milieu est éliminé et les cellules sont lavées à une reprise avec du PBS contenant

0,2% de BSA et à une reprise avec du PBS. Une fois lavées, les cellules sont solubilisées avec du NaOH à 0,1N et la radioactivité est déterminée.

2.2.6-Autres méthodes utilisées

Les concentrations en protéines des différents milieux analysés sont déterminées par la méthode de Lowry *et al.* (1951) ayant comme standard la BSA. L'analyse statistique des données a été évaluée grâce au test t de Student ou par un ANOVA (Tukey). Des valeurs sont considérées comme différentes significativement si elles ont un $P < 0,05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Les sous-classes de LDL

3.1.1 La composition en lipides des sous-classes

Le but de cette étude était de démontrer l'effet de la captation sélective par le SR-BI sur les LDL. L'hypothèse de base de l'étude est que l'action du SR-BI diminue la quantité de cholestérol estérifié des LDL. Si on se fie à cette hypothèse, l'apparition des différentes sous-classes de LDL peut être due à une activité de captation sélective plus ou moins importante du récepteur sur les LDL. Il devenait donc important de caractériser ces sous-classes à différents niveaux pour, entre autres, définir leurs capacités à interagir avec le SR-BI et le récepteur de LDL. La première étape a donc consisté à séparer les différentes sous-classes de LDL. Comme vu précédemment, les 3 sous-classes ont une composition en lipides et protéines différentes les unes des autres ce qui leur confère une densité et une taille différentes. Une fois la séparation des 3 sous-classes effectuée, les lipides de ces différentes LDL ont été dosés. La figure 1 démontre, tel qu'attendu de la littérature, que les LDL ont des niveaux plus élevés de cholestérol estérifié que de cholestérol libre. Nous n'avons toutefois observé aucune différence significative entre les niveaux de cholestérol estérifié entre les différentes sous-classes. Les triglycérides, de leur côté, ont une différence de 22% entre les sous-classes I et II versus 20% entre les sous-classes II et III. Toutefois ces différences ne sont pas statistiquement différentes étant donné le grand écart type qui est dû à la variation entre les différents plasmas obtenus. On note toutefois 40% moins de triglycérides dans la sous-classe III que dans la I et cette valeur est statistiquement significative ($p < 0,05$).

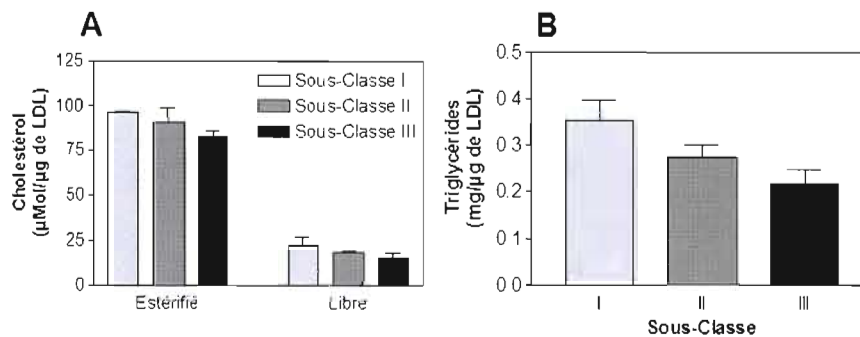


Figure 1 : Composition en cholestérol et triglycérides des sous-classes de LDL

Composition de différentes sous-classes de LDL en cholestérol estérifié et libre (A), et en triglycérides (B). Les trois sous-classes sont obtenues par ultracentrifugation différentielle de plasma humain en utilisant différentes densités selon la sous-classe. Les résultats présentés sont des moyennes \pm SEM où pour (A) $n=2$ et pour (B) $n=3$ Il n'y a pas de différence statistique.

3.1.2 La taille et la charge des sous-classes

La deuxième étape de l'expérimentation a permis de vérifier l'impact d'une variation en lipides entre les différentes sous-classes sur la charge et la taille de la LDL. Pour vérifier leurs charges, les sous-classes de LDL ont subi une migration sur un gel d'agarose-barbital. La figure 2 A démontre que la bande de la sous-classe III est légèrement plus basse que celles des deux autres. La sous-classe III serait donc chargée plus négativement que les deux autres sous-classes (figure 2 A). Pour vérifier la taille, les différents échantillons ont subi une migration sur un NDGGE. Tel qu'attendu selon la littérature, les LDL de sous-classe I sont de plus grande masse suivies de la II et de la III (figure 2 B).

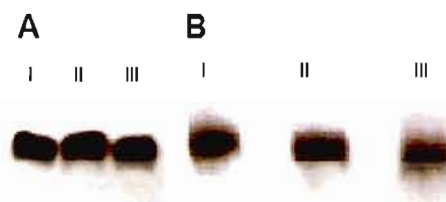


Figure 2 : Évaluation de la charge et de la taille des différentes sous-classes de LDL

Migration sur gel de barbital-agarose à 0,5% (A) et sur gradient de gel non-dénaturant de 2-16% (NDGGE) (B) des trois sous-classes de LDL. I : Sous-classe I; II : Sous-classe II; III : Sous-classe III. Un échantillon de différentes sous-classes de LDL contenant 5 µg de protéines est déposé sur

gel de barbital-agarose ou NDGGE. Une migration respective de 1h30 à 90 V et de 24h à 125 V est effectuée pour chacun des gels.

3.1.3 La susceptibilité à l'oxydation des sous-classes

La troisième étape a consisté à vérifier la susceptibilité à l'oxydation des sous-classes de LDL lorsqu'elles sont exposées au cuivre (CuSO_4). L'oxydation est révélée par l'apparition de diènes conjugués qui sont détectés à 234 nm. Tel que montré dans la figure 3, la courbe de susceptibilité à l'oxydation est la même pour les 3 sous-classes, ce qui change est la saturation de l'oxydation. En effet, la saturation de l'oxydation est beaucoup plus basse pour la sous-classe III que celles des sous-classes I et II. En effet, la sous-classe III a un plateau 28% plus bas que celui de la sous-classe I qui est 21% plus bas que celui de la sous-classe II (figure 3).

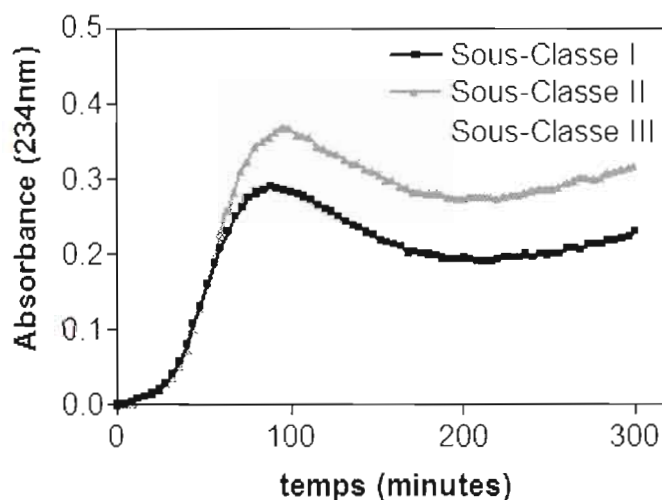


Figure 3 : Sensibilité à l'oxydation des différentes sous-classes de LDL

Évaluation de la susceptibilité à l'oxydation des sous-classes de LDL I, II et III. Des LDL [50 $\mu\text{g/mL}$] sont incubées à 37°C en présence de CuSO_4 [1,67 $\mu\text{mol/mL}$]. L'absorbance à 234 nm est prise à toutes les 2 minutes et ce pendant un total de 5 heures.

3.1.4 Le métabolisme des sous-classes *in vivo*

Afin d'estimer leur métabolisme *in vivo*, les différentes sous-classes de LDL ont été marquées radioactivement sur la portion protéique avec de l' ^{125}I et sur la

portion lipidique avec des $^3\text{H-EC}$, pour ensuite être injectées dans la circulation sanguine des souris C57BL/6. La souris C57BL/6 est utilisée ici étant donné que le métabolisme par SR-BI et rLDL est très bien répertorié dans cette souche (Brodeur *et al.* 2005). Des échantillons de sang récoltés à différents intervalles permettent de suivre la progression des lipoprotéines dans la circulation de l'animal. Il n'y a pas de différence dans la clairance des 3 sous-classes chez la souris C57BL/6 (figure 4 A et B).

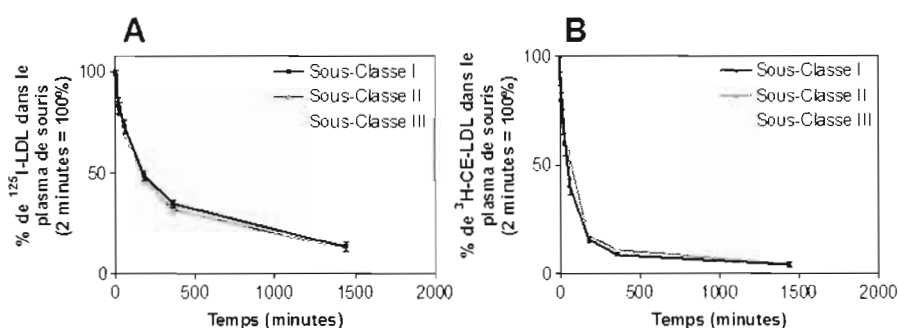


Figure 4 : Métabolisme des différentes sous-classes de LDL *in vivo* chez des souris C57BL/6

Clairance de sous-classes de LDL radioactives chez une souris C57BL/6. Un bolus composé de 50 μg de sous-classes de LDL marquées, sur la portion protéique par ^{125}I ou sur la portion lipidique avec des $^3\text{H-EC}$, et de 450 μg de sous-classes de LDL non-marquées ont été injectés dans une souris par la veine de la queue. Du sang est récolté à différent temps suite à l'injection et la radioactivité dans le plasma est déterminée. Les résultats présentés sont des moyennes \pm SEM où A) I et II n=4, III n=3 et B) I et III n=4, II n=6.

3.1.5 Le métabolisme des sous-classes de LDL *in vitro*

Afin de déterminer le métabolisme *in vitro* des sous-classes de LDL, des essais d'associations lipidique et protéique ont été effectués avec des cellules Hep G2. Pour ce faire, des cellules sont mises en présence de lipoprotéines marquées à ^{125}I pour l'association protéique et au $^3\text{H-CE}$ pour l'association lipidique. L'association est déterminée par la quantité de radioactivité absorbée par les cellules. La captation sélective est déterminée par la différence entre l'association lipidique et l'association protéique tandis que la dégradation est déterminée par les ^{125}I -peptides libre retrouvés dans le milieu. Normalement, les essais sont effectués en présence de la BSA afin de refléter la situation physiologique mais

nous les avons aussi effectué sans cette protéine, afin d'observer, par la même occasion, l'impact de la BSA sur le métabolisme des lipoprotéines. Tel que montré dans la figure 5 la présence de BSA diminue le métabolisme des lipoprotéines que se soit pour les protéines ou les lipides. Au niveau de l'association protéique, une différence significative est observable entre la sous-classe I et la III. En effet, l'association protéique de la sous-classe III est supérieure à celle de la I de 12% (figure 5 A). Par contre, cette plus grande association protéique n'est pas secondée par une différence au niveau de la dégradation protéique (figure 5 D). Pour ce qui est de l'association lipidique, il semble que la présence de BSA permette la détection d'une plus faible association lipidique chez la sous-classe II par rapport à celles des deux autres sous-classes, soit une diminution de 16% (figure 5 B). La captation sélective semble être influencée par la présence ou l'absence de BSA étant donné que pour la sous-classe II étudiée en présence de BSA, il y a diminution de 27% de la captation sélective tandis qu'en absence de BSA, il y a une augmentation de 13% par rapport à la sous-classe I (figure 5C).

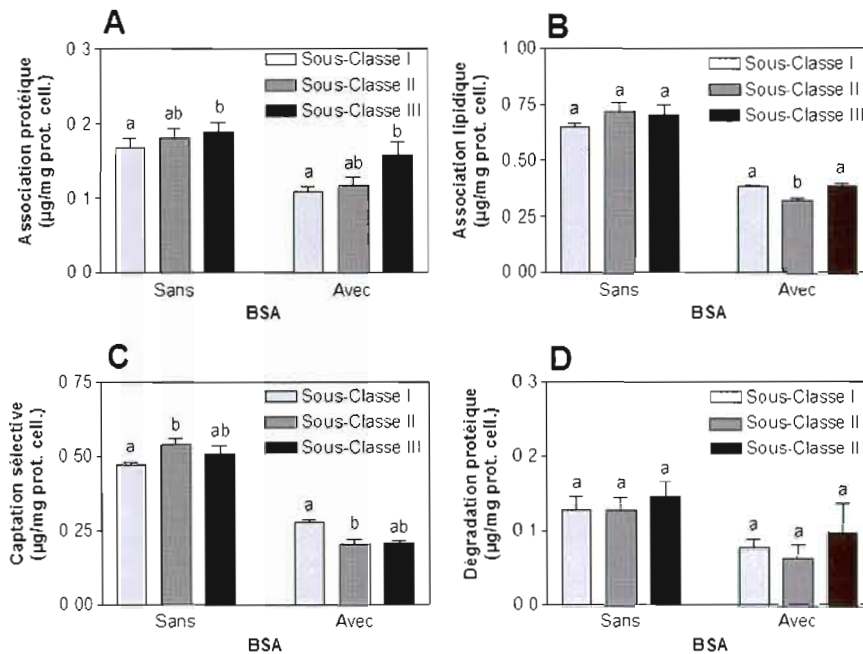


Figure 5 : Métabolisme des différentes sous-classes de LDL *in vitro* chez des cellules Hep G2.

Association protéique (A), association lipidique (B), captation sélective des EC (C) et dégradation (D) des sous-classes de LDL en présence (avec) ou en absence de BSA (sans). Des cellules Hep G2 sont exposées à 20 µg/mL de LDL (sous-classes) marquées à l'¹²⁵I pour l'association protéique et aux ³H-EC pour l'association lipidique, à 37°C pour 4 heures. Les cellules sont solubilisées et la radioactivité est déterminée. La captation sélective est déterminée par une soustraction de la valeur de l'association protéique à celle de l'association lipidique. La dégradation est obtenue par la mesure des peptides marqués à l'iode-125 et rejetés dans le milieu d'incubation. Les résultats présentés sont des moyennes +/- SEM où : A: n=4; B et C (sans BSA) : n=3; B et C (avec BSA I et III) : n=2; B et C (avec BSA II) : n=4; D (sans BSA) : n=4; D (avec BSA I et II) : n=3; D (avec BSA III) : n=4. Une différence significative (p<0.05) est observable quand la lettre d'une colonne est différente d'une autre colonne de la même catégorie. Dans le cas où nous avons ab c'est qu'il n'y a pas de différence avec la colonne qui contient un a ou un b.

Afin de mieux déterminer quelle sous-classe a le meilleur métabolisme *in vitro*, des essais de compétitions entre les sous-classes ont été effectués pour l'association protéique et lipidique. L'expérience a été effectuée à 3 reprises pour A et D et à 2 reprises pour B, C, E et F et malgré tout aucune différence significative n'est ressortie de ces expériences (figure 6).

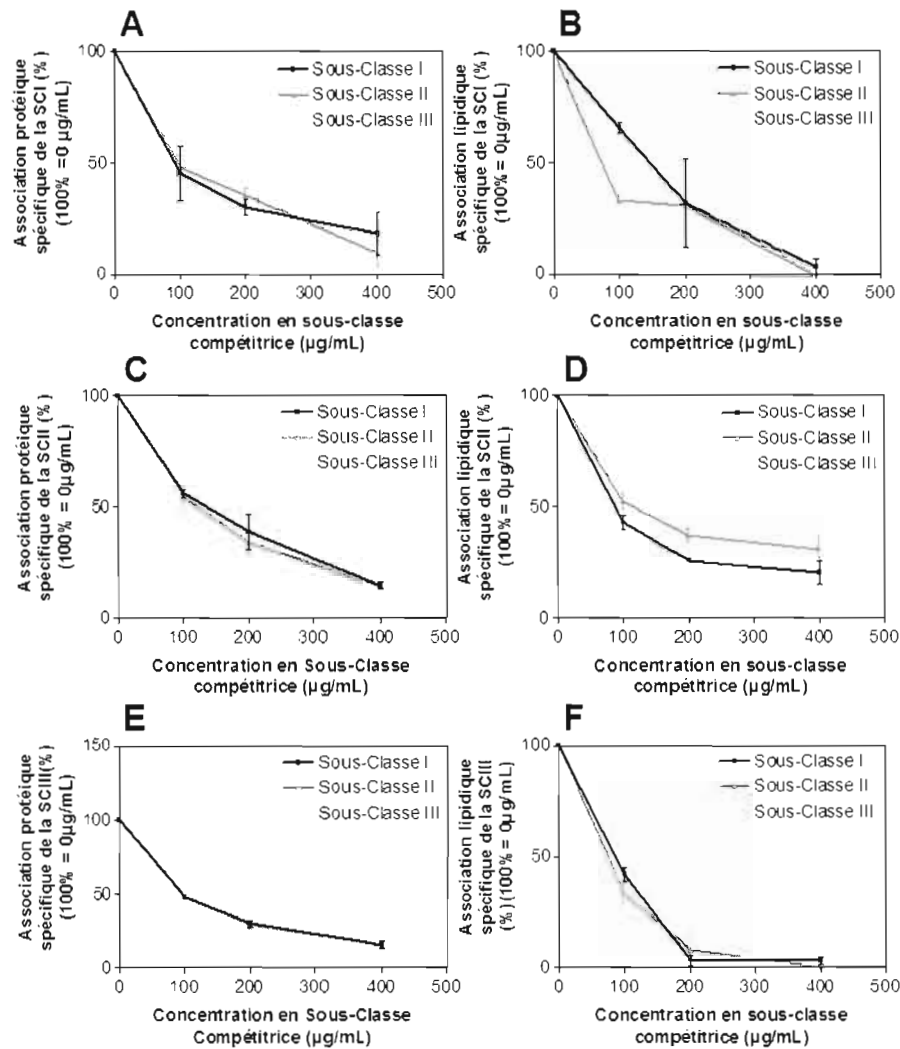


Figure 6 : Métabolisme des sous-classes de LDL *in vitro* chez des cellules Hep G2 en présence de sous-classes de LDL compétitrices

Association protéique (A, C et E) et lipidique (B, D et F) des sous-classes I (A, B), II (C, D) ou III (E, F) de LDL compétitionnées par les trois sous-classes de LDL. Des cellules Hep G2 sont exposées à 20 µg/mL de chacune des sous-classes de LDL radioactives marquées sur la portion protéique avec de l'I¹²⁵ ou sur la portion lipidique avec des ³H-CE, à 37°C pour 2 heures. La compétition est effectuée en ajoutant des concentrations croissantes des sous-classes I, II ou III. Les résultats présentés sont des moyennes +/- SEM où (A et D) n=3; (B, C, E et F) n=2.

3.2 Modification des LDL *in vitro*

Afin de maximiser l'observation de l'effet de la captation sélective sur les LDL un modèle *in vitro* a tenté d'être développé afin de produire nos propres LDL.

3.2.1 Effet sur la composition en lipides de la modification effectuée *in vitro* par des cellules Hep G2

Le premier modèle a consisté à exposer des LDL aux cellules Hep G2 étant dans un flacon de culture. Dans l'essai, deux paramètres ont varié, soit la présence et l'absence de cellules afin de s'assurer que l'effet observé sur les LDL provient bien des cellules. Le second paramètre modifié est la quantité de LDL misent dans le flacon de culture soit 4,5 ou 9 mg de LDL. Deux masses sont testées pour deux raisons : la première pour récupérer assez de matériel afin d'effectuer les tests ultérieurs, la seconde pour vérifier quelle masse permet une diminution en EC qui est observable. Les LDL ont été réisolées, après 6 heures d'incubation, et leur cholestérol et triglycérides ont été dosés. Par rapport aux LDL natives, une diminution moyenne de 41% est observable pour le cholestérol estérifié, 45% pour le cholestérol libre et de 30% pour les triglycérides, par contre aucune différence n'est observable entre l'absence et la présence de cellules (figure 7 A et B). Une diminution en cholestérol estérifié un peu plus marquée, mais non significative, est observée avec 4,5 mg de LDL ; l'expérimentation se poursuivra donc avec cette masse.

Pour permettre la croissance optimale des cellules, le fond du flacon de culture a un *coating*. Afin d'éliminer l'impact potentiel du *coating* sur la manipulation, dans une deuxième essai, l'expérimentation a été effectuée sur des cellules préalablement misent en suspension par l'action de la trypsine. La suspension de cellules est conservée soit dans des tubes de verre de 15 mL (V) et de plastique de 15 (P15) ou 50 mL (P50) sous agitation avec oxygénation. Dans ce cas, aucune diminution en lipides n'est observable avec et sans cellules en suspension (figure 7 C et D).

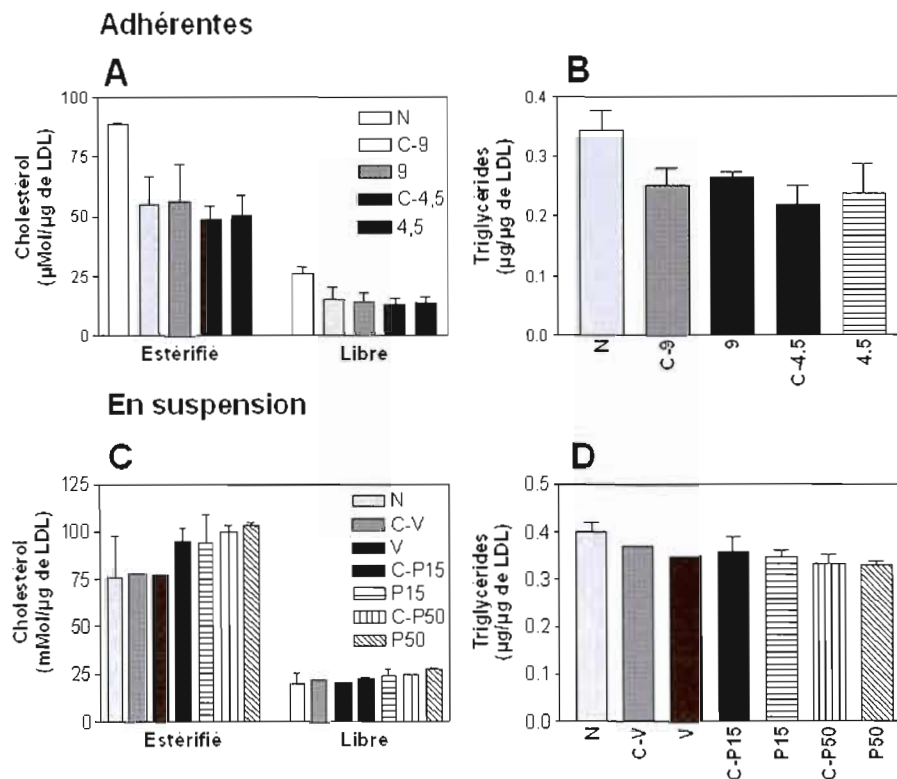


Figure 7 : Effet d'une incubation avec des cellules Hep G2 adhérentes ou en suspension sur la composition lipidique des LDL

Composition en cholestérol estérifié et libre (A, C), et en triglycérides (B, D) de LDL ayant subies différents traitements. Les LDL natives (N) sont des LDL qui ont été isolées à partir d'un plasma humain par ultracentrifugation différentielle. Celles-ci sont utilisées afin de générer les autres types de LDL. Deux types d'essais ont été effectués : l'un avec des cellules adhérentes (A, B) et l'autre avec des cellules en suspension (C, D). Dans le cas des cellules adhérentes, deux quantités de LDL, soit 4,5 et 9 mg ont été déposées dans du milieu MEM dans un flacon de culture de 225 cm^2 ensemencé de cellules Hep G2. Un contrôle sans cellule est effectué avec les deux masses de LDL (C-4,5 et C-9). Dans le cas des cellules en suspension, plusieurs contenants ont été utilisés, soit des tubes de 15 mL en verre (V) ou des tubes de polypropylène de 15 ou de 50 mL (P15 ou P50). Des LDL, des cellules Hep G2 et du MEM ont été déposés dans les différents tubes sorte à avoir une concentration finale de 300 μg de protéine/mL de LDL. Un contrôle a été effectué sans cellules (C-V, C-P15 et C-P50). Les résultats présentés sont des moyennes \pm SEM où A et B) $n=2$; C et D) $n=1$, P15 et P50 natives) $n=2$.

3.2.2 Effet de la mise en suspension des cellules sur l'expression du SR-BI

L'absence de diminution lipidique nous a poussé à vérifier la présence du récepteur SR-BI chez les cellules Hep G2 adhérentes et en suspension. Pour ce

faire, un Western Blot a été effectué sur des cellules en suspension et des cellules adhérentes. Il est possible de remarquer à la figure 8 que le niveau du SR-BI chez les cellules adhérentes est beaucoup plus grand que chez les cellules en suspension.

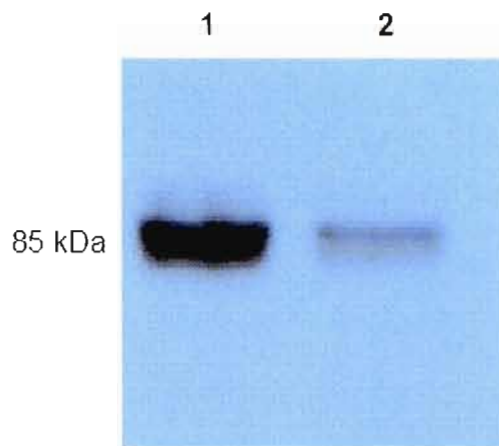


Figure 8 : Effet de la mise en suspension des cellules Hep G2 sur l'expression du récepteur SR-BI

Immunodétection de l'expression du SR-BI chez des cellules Hep G2 adhérentes et des cellules Hep G2 en suspension. Les cellules sont solubilisées tel que décrit dans la section Matériel et méthodes, puis 50 µg de protéines des cellules Hep G2 adhérentes (1) et en suspension (2) ont été séparés sur gel de SDS-PAGE et immunodétectés avec des anticorps polyclonaux de SR-BI suivi d'une détection par chemiluminescence.

3.3 Modification des LDL *in vivo*

Étant donné que les expériences *in vitro* n'ont pas donné de résultats concluants, un modèle *in vivo* a été développé afin d'observer plus facilement l'effet de la captation sélective sur les LDL. En effet, des expériences effectuées par Mr Brodeur (Brodeur et al. 2005) ont démontré que la mise en circulation de LDL chez des souris C57BL/6 modifie la migration sur NDGGE et agarose-barbital. Par contre, plusieurs modèles seront testés afin de minimiser l'utilisation d'animaux.

3.3.1 Chez le rat Sprague-Dawley

3.3.1.1 Métabolisme du rat Sprague-Dawley

Le premier animal qui a été utilisé a été le rat Sprague-Dawley. La première étape consistait à vérifier qu'il y a de la captation sélective chez cet animal. Pour ce faire, un animal a été injecté avec des LDL radioactives soit marquées à l' ^{125}I ou en ^3H -cholestérol oléate et la radioactivité a été mesurée dans le plasma à différents temps. Les résultats sont un pourcentage de la radioactivité présente au temps X sur la radioactivité du temps 2 minutes. Ceux-ci ne permettent pas d'établir une proportion de captation sélective mais plutôt permettent de déterminer s'il y a captation sélective. Dans la figure 9, 360 minutes suite à l'injection des lipoprotéines, 25% de l' ^{125}I est disparu de la circulation sanguine. Par contre, 95% des ^3H -EC sont disparus. L'iode 125 représente la portion protéique. Si la portion protéique disparaît c'est que la LDL est entièrement dégradée par la voie de captation globale. Dans le cas des EC marqués au ^3H , 25% de la disparition des ^3H -EC est causée par la captation globale tandis que le restant est due à la captation sélective. Ainsi, la figure 9 démontre qu'il y a de la captation sélective d'esters de cholestérol de LDL chez les rats Sprague-Dawley puisque le ^3H -cholestérol-oléate disparaît plus rapidement que l' ^{125}I .

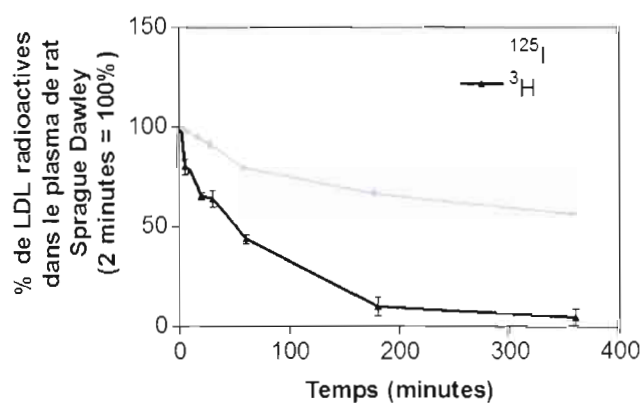


Figure 9 : Métabolisme des LDL chez le rat Sprague Dawley

Clairance de LDL radioactives chez un rat Sprague Dawley. Un bolus composé de 50 μg de LDL marquées, sur la portion protéique par l' ^{125}I ou sur la portion lipidique avec des ^3H -EC, et de 450 μg de LDL non-marquées a été injecté dans un rat par la veine de la queue. Du sang a été récolté à

différent temps suite à l'injection et la radioactivité dans le plasma a été déterminée. Les résultats présentés sont des moyennes \pm SEM où $n=2$.

3.3.1.2 Effet de la modification *in vivo* chez le rat Sprague Dawley sur la composition en lipides des LDL

Afin de déterminer les conditions permettant la production d'une grande quantité de LDL le plus appauvries en EC possible, une cinétique a été réalisée. Ainsi les LDL ont été injectées pour différents temps soit 1, 3 ou 6 heures dans des rats et récupérées par ponction cardiaque. Les LDL ont été ré-isolées par ultracentrifugations afin de déterminer le temps d'incubation optimal pour observer une modification des LDL. Il est possible de remarquer que plus les LDL sont en circulation, plus il y a une modification au niveau lipidique. En effet le cholestérol estérifié subi une diminution de 3% en 1 h, 9% en 3 h et 13% en 6h. Pour ce qui est des triglycérides, la diminution est plus drastique soit 39% en 1 h, 59% en 3h et 78% en 6h (Figure 10). Pour les expériences ultérieures, nous avons conservé le temps de 3 heures puisqu'il est possible d'observer une certaine diminution en cholestérol estérifié ainsi qu'une diminution importante en triglycérides, tout en conservant une quantité suffisante de LDL pour le ré-isolément (les LDL en circulation étant métabolisé).

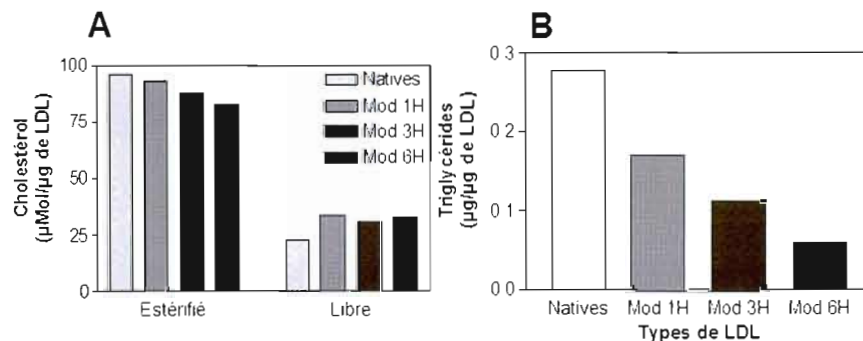


Figure 10 : Effet de la circulation des LDL dans le système sanguin du rat Sprague-Dawley sur leur compositions lipidiques, en fonction du temps

Composition de différentes LDL en cholestérol estérifié et libre (A), et en triglycérides (B) en fonction de différentes périodes d'incubation dans l'animal. Les LDL natives sont des LDL isolées à partir d'un pool de plasma humain. Les LDL Mod 1H, 3H et 6H sont des LDL natives injectées dans un rat dont le sang est récupéré 1, 3 ou 6 heures plus tard. ($n=1$)

La forte diminution en triglycérides pourrait être attribuable à l'action de la LPL qui hydrolyse les triglycérides. Afin de mesurer l'impact du SR-BI sur la captation sélective des lipides des LDL sans l'action de la LPL, des rats ont été préalablement injectés avec de la protamine sulfate [25 mg/kg] pendant 30 minutes avant l'injection des LDL. Il a été prouvé antérieurement que la protamine sulfate inhibe la LPL. Ce nouvel élément permet d'annuler la diminution en triglycérides (figure 11). Il est aussi possible de remarquer que la diminution en EC est plus faible avec l'action de la protamine. Il est souhaitable pour l'expérimentation de générer des LDL ayant une diminution en EC maximale. Ceci étant dit, les expérimentations subséquentes s'effectueront sans la protamine pour maximiser cette diminution en EC.

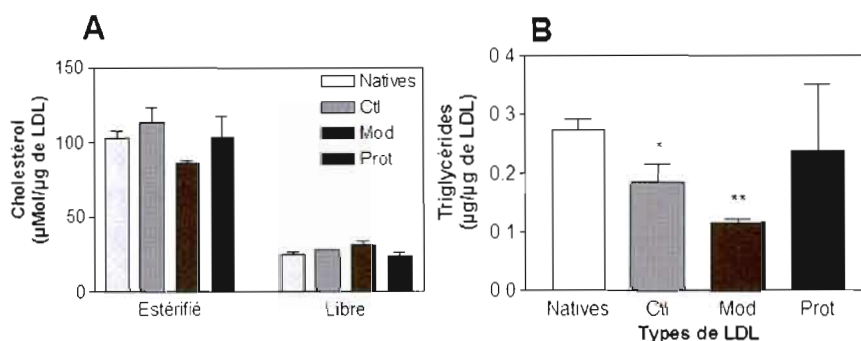


Figure 11 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin du rat Sprague-Dawley sur la composition lipidique de ces lipoprotéines.

Composition de différentes LDL en cholestérol estérifié et libre (A), et en triglycérides (B). Les LDL natives sont des LDL isolées à partir d'un pool de plasma humain. Les LDL Ctl sont des LDL natives injectées dans un rat dont le sang est récupéré immédiatement. Les LDL Mod sont des LDL natives injectées dans un rat dont le sang est récupéré 3 heures plus tard. Les LDL Prot sont des LDL natives injectées dans un rat 30 minutes suite à une injection de protamine [25 mg/kg] et dont le sang est récupéré 3 heures plus tard. Les résultats présentés sont des moyennes +/- SEM où Natives et Mod) n=5, Ctl et Prot) n=2. (Statistiquement différents par rapport au native * : p<0,05; ** : p>0.001)

3.3.1.3 Effet de la modification *in vivo* chez le rat Sprague Dawley sur la taille et la charge des LDL

Pour déterminer la charge des LDL modifiées *in vivo*, une migration a été effectuée sur gel d'agarose-barbital. Une plus grande migration par rapport aux

LDL natives est observée tant pour les LDL qui ont circulées dans le rat avec (protamine) ou sans protamine (modifiées) que pour les LDL qui ont été conservées dans le sang d'un rat (contrôle) pendant 3 heures (figure 12 A). Ceci suggère une augmentation de la charge négative des lipoprotéines. Dans ces trois mêmes cas, il est aussi possible de voir une seconde population de LDL de faible intensité beaucoup plus chargée négativement (figure 12 A). Une autre électrophorèse a été réalisée, cette fois sur gel de NDGGE pendant 24h afin d'évaluer la taille des différents types de LDL. Celle-ci reste similaire dans tous les cas (figure 12 B). Par contre, il n'y a pas de seconde population plus bas dans le gel, ce qui indique que la population la plus chargée sur le gel d'agarose-barbital est de la même grosseur que celle moins chargée.

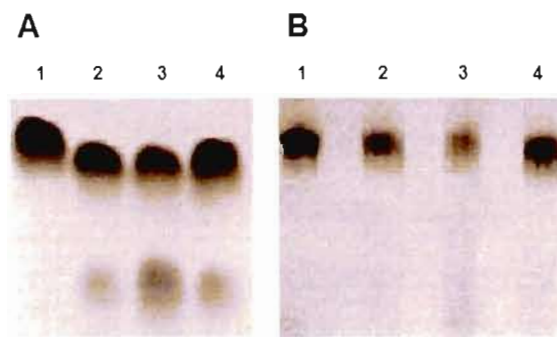


Figure 12 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin du rat Sprague-Dawley sur la charge et la taille de ces LDL

Migration sur gel de barbital-agarose à 0,5 % (A) et sur gradient de gel non-dénaturant de 2-16 % (NDGGE) (B) de différentes LDL. 1 : Natives; 2 : Mod; 3 : Prot; 4 : Ctl. Un échantillon de différentes LDL contenant 5 µg de protéine est déposé sur gel de barbital-agarose et NDGGE. Une migration respective de 1h30 à 90 V et de 24h à 125 V est effectuée pour chacun des gels.

3.3.1.4 Effet de la modification *in vivo* chez le rat Sprague Dawley sur la capacité de compétition des LDL par rapport aux LDL natives marquées sur la portion protéique

Les LDL recueillies ont été utilisées pour faire différents essais. Le premier essai effectué a été un de compétition entre des ^{125}I -LDL natives et une concentration croissante de LDL modifiées 3 heures chez le rat (Mod 3H) versus de LDL

natives. Le but était de déterminer si les LDL Mod 3H compétitionnent plus efficacement les LDL natives radioactives que les LDL natives. Il ne semble pas y avoir une différence d'association dans ce cas (figure 13 A), par contre quand des HDL₃ sont ajoutées, afin de saturer le récepteur SR-BI et ne laisser aux LDL que la capacité de se lier au rLDL, on peut observer une diminution de la capacité de compétition des LDL Mod 3H versus les LDL natives (figure 13 B). Ceci indique une plus grande affinité des LDL Mod 3H pour le récepteur SR-BI par rapport aux LDL natives. En comparant les deux essais de compétition, la présence des HDL₃ cause une diminution de 15 à 25% de la compétition effectuée par les LDL Mod 3H.

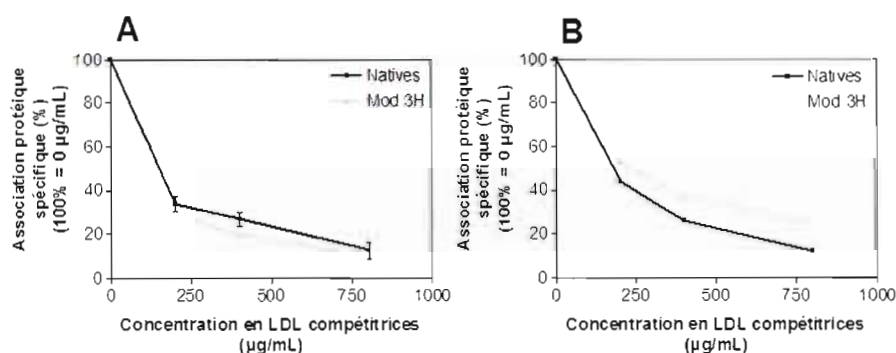


Figure 13 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin du rat Sprague-Dawley sur leurs capacités à compétitionner les LDL natives marquées sur leur portion protéique

Association protéique, en absence (A) ou en présence de HDL₃ à 1500 µg/mL (B), de LDL natives en présence de différents types de LDL compétitrices. Des cellules Hep G2 sont exposées à 20 µg/mL de LDL marquées sur la portion protéique par l'¹²⁵I, et des concentrations croissantes de LDL (natives ou Mod 3H) avec ou sans 1500 µg/mL de HDL₃ à 37°C pour 4 heures. Les résultats présentés sont des moyennes +/- SEM où A) n=2 et B) n=1.

3.3.1.5 Effet de la modification *in vivo* chez le rat Sprague Dawley sur la capacité de compétition des LDL par rapport aux LDL natives marquées sur la portion lipidique

Le même essai est refait mais cette fois avec des LDL natives marquées dans la portion lipidique avec des ³H-EC. Il apparaît que les LDL Mod 3H sont de meilleurs ligands que les natives (figure 14 A). En effet, on observe une

diminution très marquée de la compétition, soit entre 17 à 34%. Dès que le SR-BI est saturé, cet effet disparaît (figure 14 B). Ceci confirme les résultats obtenus précédemment comme quoi l'affinité des LDL Mod 3H est plus grande pour le SR-BI que les LDL natives.

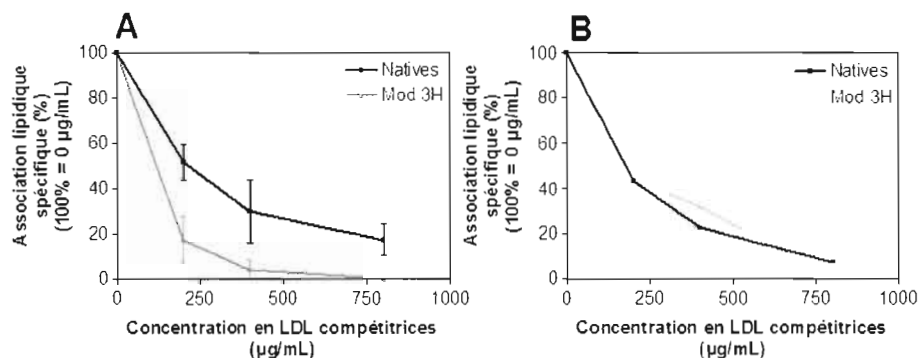


Figure 14 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin du rat Sprague-Dawley sur leurs capacités à compétitionner les LDL natives marquées sur leur portion lipidique

Association lipidique, en absence (A) ou en présence de HDL₃ à 1500 µg/mL (B), de LDL natives en présence de différents types de LDL compétitrices. Des cellules Hep G2 sont exposées à 20 µg/mL de LDL radioactives marquées sur la portion lipidique avec des ³H-EC à 37°C pour 4 heures. La compétition est effectuée en ajoutant des concentrations croissantes de LDL (natives, Mod 3H). Les résultats présentés sont des moyennes +/- SEM où A) n=2 et B) n=1.

3.3.2 Chez les souris C57BL/6

Chez les souris C57BL/6, il n'a pas été nécessaire de vérifier la capacité d'effectuer la captation sélective étant donné que leur potentiel est déjà très bien connu (Brodeur *et al.* 2005).

3.3.2.1 Effet de la modification des LDL *in vivo* chez les souris C57BL/6 sur la composition lipidique des LDL

Le modèle C57BL/6 comporte l'avantage d'avoir une plus faible diminution en triglycérides (figure 15 B) par rapport au rat, accompagnée d'une diminution en cholestérol estérifié (figure 15 A). Par rapport aux LDL natives, les LDL ayant été conservées dans du plasma de souris pendant 3 heures ont eu une diminution en triglycérides de 7% (Ctl). La circulation de 3 heures dans la souris (Mod) a augmenté cette diminution en triglycérides à 17%, toujours en comparant aux

LDL natives. Dès qu'il y a de la protamine sulfate (Prot) la situation redevient comparable à celle du contrôle soit une diminution de 5% (figure 15 B). Le cholestérol estérifié subit une diminution par rapport au LDL natives de 7% pour le contrôle et de 19% pour les LDL Mod et Prot. Par contre, ces diminutions ne sont pas suffisantes pour obtenir une différence significative par rapport aux LDL natives de plus nombreuses expériences sont nécessaires. Nous étions donc toujours à la recherche d'un autre système.

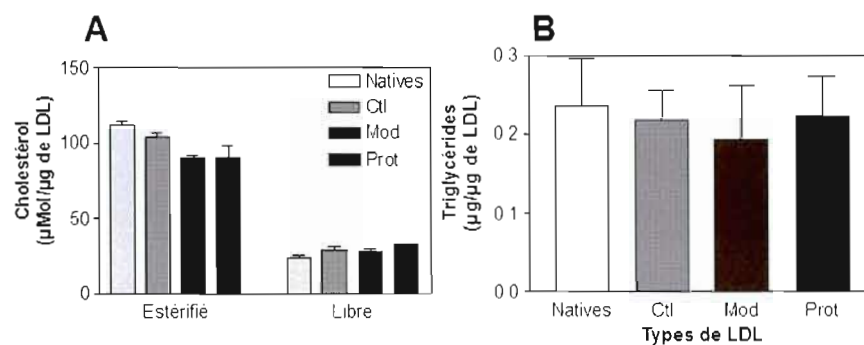


Figure 15 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris C57BL/6 sur la composition lipidique de ces LDL

Composition de différentes LDL en cholestérol (A) et en triglycérides (B). Les LDL natives sont des LDL isolées à partir d'un pool de plasma humain. Les LDL Ctl sont des LDL natives injectées dans une douzaine de souris C57BL/6 dont le sang est récupéré immédiatement. Les LDL Mod sont des LDL natives injectées dans des souris C57BL/6 dont le sang est récupéré 3 heures plus tard. Les LDL Prot sont des LDL natives injectées dans des souris C57BL/6, 30 minutes suite à une injection de protamine [25 mg/kg] et dont le sang est récupéré 3 heures plus tard. Les résultats présentés sont des moyennes +/- SEM où n=2.

3.3.3 Chez les souris CD1

3.3.3.1 Métabolisme des LDL chez la souris CD1

La première étape a consisté à vérifier qu'il y a de la captation sélective chez la souris CD1. Il est possible de savoir qu'il y a captation sélective étant donné que la courbe de clairance du ^3H est plus basse que celle de l' ^{125}I (figure 16).

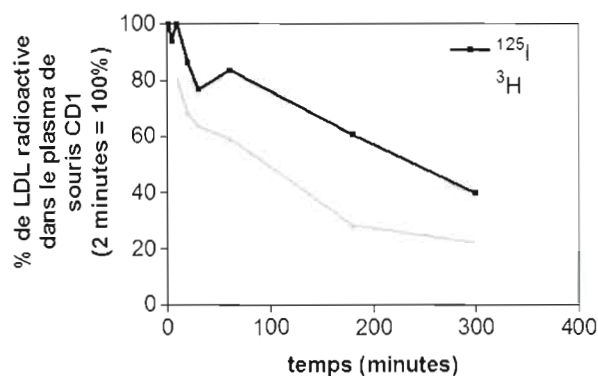


Figure 16 : Métabolisme des LDL chez la souris CD1

Clairance de LDL radioactives chez une souris CD1. Un bolus composé de 50 μg de LDL marquées sur la portion protéique par ^{125}I ou sur la portion lipidique avec des ^3H -CE, et de 450 μg de LDL non-marquées a été injecté dans une souris par la veine de la queue. Du sang a été récolté à différents temps suite à l'injection et la radioactivité dans le plasma a été déterminée. (n=1)

3.3.3.2 Effet de la modification *in vivo* chez la souris CD1 sur la composition lipidique des LDL

Afin de modifier les LDL par l'action du récepteur SR-BI, les LDL ont été injectées dans la souris CD1, récupérées et isolées 3 heures plus tard (LDL Mod) tandis que les LDL Ctl ont été déposées dans du plasma de souris puis ré-isolées afin d'éliminer l'impact du plasma des souris et de toutes les manipulations d'isolement sur les LDL. Les LDL récupérées ont été caractérisées au niveau des lipides. Les LDL Mod et Ctl, ont une diminution du cholestérol estérifié significative par rapport aux LDL natives de 30% (figure 17 A). Une diminution statistiquement significative de 52% des triglycérides (figure 17 B) des LDL Mod est aussi observée. Pour une fois que nous avons généré des LDL clairement appauvries en esters de cholestérol, nous ne pouvions attribuer cette diminution à l'activité SR-BI, car une simple incubation avec du sang de souris les appauvries tout aussi bien. Nous avons toutefois poursuivi l'analyse de ces particules lipoprotéiques.

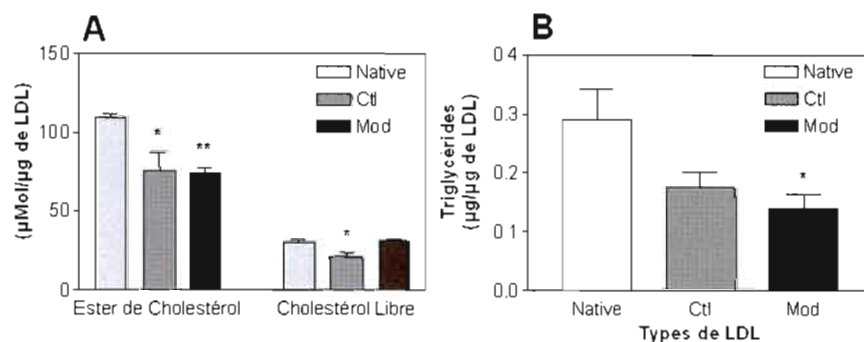


Figure 17 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris CD1 sur la composition lipidique de ces LDL

Composition de différentes LDL en cholestérol estérifié et libre (A), et en triglycérides (B). Les LDL natives sont des LDL isolées à partir d'un pool de plasma humain. Les LDL Ctl sont des LDL natives injectées dans des souris CD1 dont le sang est récupéré immédiatement. Les LDL Mod sont des LDL natives injectées dans des souris CD1 dont le sang est récupéré 3 heures plus tard. Les résultats présentés sont des moyennes +/- SEM où n=3. (Statistiquement différents par rapport aux natives * : p < 0,05; ** : p < 0,01)

3.3.3.3 Effet de la modification *in vivo* chez la souris CD1 sur la charge et la taille des LDL

L'analyse des charges par électrophorèse sur gel de barbital-agarose (figure 18 A) révèle que celle des LDL Ctl est plus négative que celle des LDL Mod, qui sont quant à elles plus chargées négativement que les LDL natives. Les LDL Mod ont migré plus loin sur NDGGE que les natives et les LDL Ctl plus loin que les LDL Mod. Ceci indique que les LDL Ctl sont plus petites que les LDL Mod, qui sont plus petites que les LDL natives (figure 18 B).

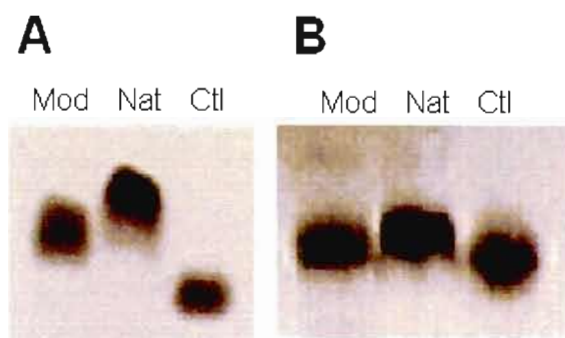


Figure 18 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris CD1 sur la charge et la taille de ces LDL

Migration sur gel de barbital-agarose à 0,5 % (A) et sur gradient de gel non-dénaturant de 2-16% (NDGGE) (B) de différentes LDL. Un échantillon de différentes LDL contenant 5 μ g de protéine est déposé sur gel de barbital-agarose ou NDGGE dans l'ordre 1 : Mod; 2 : Natives; 3 : Ctl. Une migration respective de 1h30 à 90 V et de 24h à 125 V est effectuée pour chacun des gels.

3.3.3.4 Effet de la modification *in vivo* chez la souris CD1 sur la susceptibilité à l'oxydation des LDL

Pour ce qui est de la susceptibilité à l'oxydation (figure 19), les différentes LDL atteignent une oxydation maximale à différentes valeurs d'absorbance. Les LDL Ctl ont la plus basse valeur d'absorbance pour une oxydation maximale, suivi des LDL Mod et des LDL natives. Par contre l'oxydation semble débiter plus rapidement chez les LDL Ctl, suivi de près par les LDL natives et les LDL Mod.

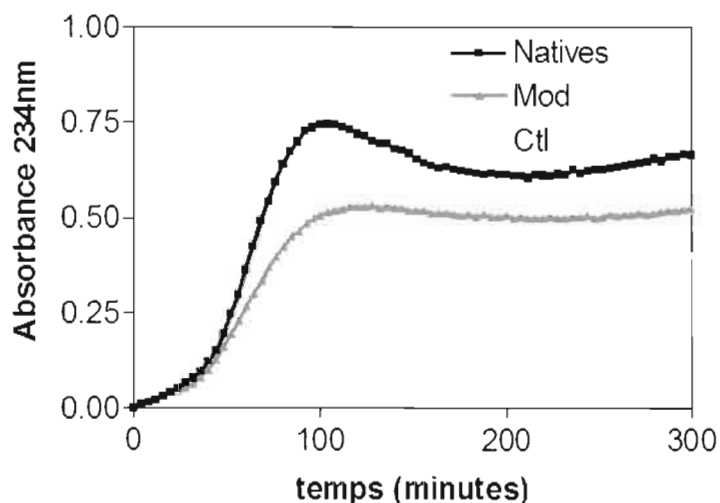


Figure 19 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris CD1 sur la susceptibilité à l'oxydation de ces LDL

Évaluation de la susceptibilité à l'oxydation des LDL natives, contrôles et modifiées. Brièvement 50 $\mu\text{g/mL}$ de LDL sont incubés à 37°C en présence de CuSO_4 [1.67 $\mu\text{mol/mL}$]. L'absorbance à 234 nm est prise à toutes les 2 minutes et ce pendant un total de 5 heures.

3.3.3.5 Effet de la modification *in vivo* chez la souris CD1 sur le métabolisme *in vitro* des LDL

Afin de déterminer le métabolisme *in vitro* des différentes lipoprotéines, des essais d'association lipidique et protéique ont été effectués avec des cellules Hep G2. Les essais effectués démontrent une diminution de l'association protéique de 26% (figure 20 A) et de la dégradation de 33% (figure 20 D) chez les LDL Mod par rapport aux LDL Natives. Pour ce qui est de l'association lipidique (figure 20 B) et de la captation sélective (figure 20 C), celles-ci sont augmentées respectivement de 29% et de 62% par rapport à celles des LDL Natives.

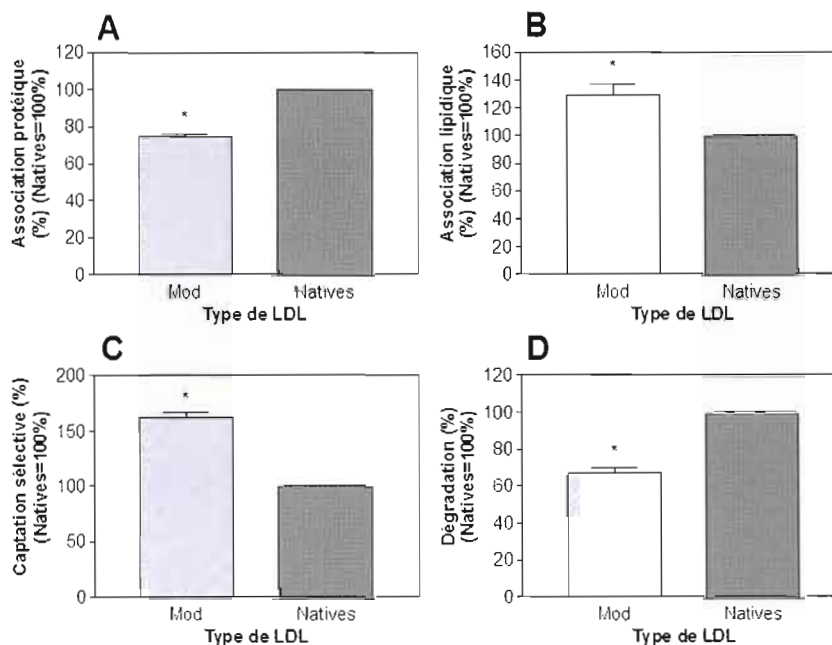


Figure 20 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris CD1 sur le métabolisme *in vitro* de ces lipoprotéines

Association protéique (A), association lipidique (B), captation sélective des EC (C) et dégradation (D) de différents types de LDL. Des cellules Hep G2 sont exposées à 20 $\mu\text{g/mL}$ de LDL (Mod ou Natives), marquées à l' ^{125}I pour l'association protéique et aux $^3\text{H-CE}$ pour l'association lipidique. à 37 °C pour 4 heures. Les cellules sont solubilisées et la radioactivité est déterminée. La captation sélective est déterminée par une soustraction de la valeur de l'association protéique à celle de la valeur de l'association lipidique. La dégradation est obtenue par l'iode libre présente dans le milieu incubé avec les cellules. Les résultats présentés sont des moyennes \pm SEM où A, B et D n=5 alors que C n=4. (Statistiquement différents par rapport aux natives *** $p < 0,005$ * $p < 0,05$)

3.3.3.6 Effet de la modification *in vivo* chez la souris CD1 sur la capacité de compétition des LDL par rapport à d'autres ligands du récepteur SR-BI

Différents essais de compétition ont été effectués avec des cellules Hep G2. Les compétiteurs utilisés sont des LOX, des FOX, des HDL₃ et des LDL natives. Différents ligands ont été utilisés afin de mettre différentes caractéristiques des lipoprotéines en évidence. Les LDL oxydées (LDLox) sont connues pour être des ligands de SR-BI, mais pas du rLDL. Différents niveaux d'oxydation permettent l'inhibition plus ou moins marquée de l'association des différentes lipoprotéines.

Les LOX et HDL₃ montrent que les LDL Mod ont une affinité plus faible pour le SR-BI que les LDL natives, en ayant une diminution plus marquée de l'association. Par contre, lorsque l'on a des LDL fortement oxydées (FOX), il y a peu de différence entre les LDL Mod et les LDL natives. Les LDL natives permettent la compétition de plusieurs récepteurs dont le SR-BI et le rLDL, ce qui explique que la diminution est beaucoup plus forte.

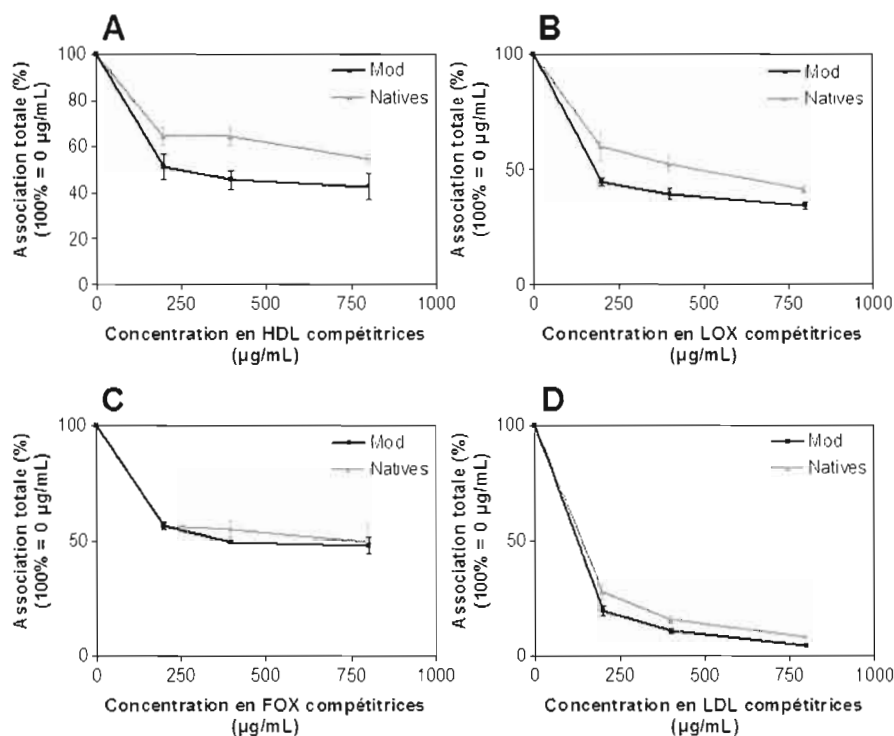


Figure 21 : Effet d'une circulation de LDL dans le système sanguin de la souris CD1 sur leur métabolisme *in vitro* en présence de différents ligands du SR-BI

Association protéique de LDL Mod et de LDL natives en présence de concentrations croissantes de HDL (A), de LOX (B), de FOX (C) et de LDL (D). Des cellules Hep G2 sont exposées à 20 µg/mL de LDL radioactives, marquées sur la portion protéique par l'¹²⁵I (Natives ou Mod), à 37°C pour 2 heures. La compétition est effectuée en ajoutant des concentrations croissantes de différentes lipoprotéines. Les résultats présentés sont des moyennes +/- SEM où Mod n=3 et Natives n=2.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les objectifs de l'étude sont de déterminer si la captation sélective produite par le SR-BI est bénéfique pour l'organisme et de créer un modèle afin de générer des LDL ayant subi la captation sélective.

4.1 Les sous-classes de LDL

L'évaluation de la composition en EC des différentes sous-classes de LDL est différente ce qui est rapporté dans la littérature (Berneis et Krauss 2002). En effet, la sous-classe la plus riche en EC est la I suivi de la II et finalement la III. Tandis que la littérature rapporte une plus forte quantité d'EC chez la III suivi de la II et finalement la I. La technique d'isolement pourrait être à la source de la différence entre la littérature et les résultats obtenus. Il serait bénéfique d'isoler les sous-classe en utilisant deux technique différentes afin d'évaluer l'impact de l'isolement sur la composition lipidique des lipoprotéines. Pour ce qui est des TG, ceux-ci sont en plus grande quantité chez la I suivi de la II et finalement la III. Les quantités de lipide mesurées chez les différentes sous-classe concorde avec la taille des LDL déterminé par la migration sur NDGGE, car plus la LDL est riche en lipide plus celle-ci est grosse. La sous-classe I est en effet la plus grosse, suivie de la II et de la III. Au niveau de la charge, la sous-classe III semble être légèrement plus chargée négativement que les deux autres. Ceci pourrait indiquer un très léger début d'oxydation par rapport aux deux autres sous-classes ou la lipoprotéine est légèrement plus négative due à sa composition. En effet, quand une LDL est oxydée, celle-ci migre plus loin dans le gel par rapport à une LDL non oxydée. Plus la LDL est fortement oxydée plus elle migre loin. L'évaluation de la susceptibilité à l'oxydation révèle que le plateau des sous-classes I et III est

plus bas que pour celui de la sous-classe II, donc que la sous-classe II a subi une plus grande formation de diènes conjugués que la sous-classe I et III. Elle est donc plus fortement oxydable. Pour la sous-classe III, il semble normal que la formation de diènes conjugués soit plus faible car celle-ci a une composition lipidique plus petite que les autres. Ainsi la disponibilité du substrat permettant la peroxydation lipidique pourrait être responsable de l'atteinte un plateau plus bas que les deux autres sous-classes. Pour la sous-classe I, la susceptibilité à l'oxydation n'est pas comme il était attendu. En effet, en ayant une composition plus riche en lipide, la sous-classe I aurait dû atteindre un plateau plus haut que celui de la sous-classe II, qui elle a moins de EC et de TG.

Le métabolisme *in vivo* permet d'observer une clairance un peu plus rapide de la sous-classe III que des deux autres sous-classes. La sous-classe III aurait donc une meilleure affinité que les autres pour le rLDL. Cette observation appuie le fait qu'il n'y a pas d'oxydation chez cette lipoprotéine car l'oxydation diminue l'affinité de la LDL pour le rLDL. Il est surprenant que la sous-classe III soit celle qui est le mieux métabolisée lorsqu'on suit sa fraction protéique, un indicateur de l'activité de captation globale par la voie du rLDL. En effet, la théorie rapporte que la sous-classe II (densité de 1,032 à 1,038 g/mL) serait celle qui a le plus d'affinité pour le rLDL (Nigon *et al.* 1991, Campos *et al.* 1996). L'étude du métabolisme *in vitro* confirme ce qui vient d'être observé *in vivo*. En effet, l'association protéique de la sous-classe III est plus grande que celle de la sous-classe II. La dégradation de la sous-classe III semble aussi plus élevée que celles des autres sous-classes, mais toutefois, la grande variabilité dans les résultats ne permet pas de poser des conclusions définitives. Une plus grande quantité d'essais auraient probablement permis la mise en valeur de cette différence.

La BSA est généralement présente au sein des essais *in vitro* afin de recréer un milieu proche du plasma sanguin. Nous avons aussi voulu mesurer l'impact de la BSA dans nos milieux d'incubation parce qu'au moment de cette partie de l'étude, nous doutions de la qualité de ce produit commercial. Les nombreux

essais *in vitro* effectués avec les LDL sur les cellules Hep G2 ont toujours confirmé que les cellules effectuent de la captation sélective. L'achat d'un nouveau numéro de lot de BSA n'a pas permis l'observation de captation sélective chez ces mêmes cellules. Ceci nous a forcé à évaluer les différences qui apparaissent entre les essais effectués avec et sans BSA. Nos résultats ont démontré que la présence de BSA dans le milieu de l'essai diminue l'association et la dégradation des LDL par les cellules Hep G2, mais en conservant les mêmes proportions entre les différentes sous-classes. Pour ce qui est de l'association lipidique, la présence de BSA et son absence ne donnent pas les mêmes résultats. En effet, en présence de BSA permet d'observer une différence significative entre l'association lipidique de la sous-classe II par rapport à la I et la III. En absence de BSA la sous-classe II semble avoir une association lipidique plus élevée que les 2 autres. La seule différence entre ces essais la présence de la BSA. Il est possible que la BSA soit la source de ce problème. La théorie rapporte que la BSA malonylée (M-BSA) est un ligand du SR-BI (Acton *et al.* 1994). La BSA malonylée est produite par l'ajout d'anhydride maléique qui est produit par l'oxydation de benzène ou autre cycle aromatique (Goldstein *et al.* 1979). Ainsi, la présence de M-BSA pourrait modifier les résultats obtenus du côté lipidique, un reflet de la capacité de captation sélective, en ayant une meilleure association que certaines sous-classes de LDL au SR-BI. La captation sélective se trouve aussi à avoir des résultats différents. En effet, l'absence de BSA permet d'observer une augmentation de captation sélective tandis qu'en présence de BSA, il y a une diminution de la captation sélective. Il apparaît donc possible que la qualité de la BSA commerciale n'est pas toujours à la hauteur et qu'elle devrait être vérifiée avant de procéder à des essais.

4.2 Modèle *in vitro* chez les cellules Hep G2

Lors du développement du modèle *in vitro*, plusieurs essais ont été effectués. Le premier a consisté à faire varier la quantité de LDL, soit une quantité de 9 et de 4,5 mg chez des cellules conservées dans des flacons de culture. La plus grande

quantité permet de s'assurer de récupérer suffisamment de lipoprotéines et ce malgré la captation globale et les pertes subies lors des manipulations. La plus petite quantité devait permettre d'observer si l'impact de la captation sélective serait en corrélation inverse avec la concentration. Tel qu'attendu, une diminution du cholestérol est retrouvée chez les LDL récupérées. Par contre, il est impossible d'affirmer si cette diminution est due à l'action du SR-BI, étant donné qu'elle se retrouve aussi dans des conditions dans cellules.

Les flacons de culture utilisés pour l'essai ont un enduit hydrophile (*coating*) sur la surface afin de faciliter la croissance cellulaire dans les flacons. Afin d'éliminer l'influence que pourrait avoir le *coating*, l'essai a été effectué sur des cellules préalablement mises en suspension grâce à l'action de la trypsine. Pour trouver la condition idéale et minimiser l'impact des matériaux et des volumes sur l'essai, celui-ci a été effectué dans différents contenants. Ainsi, le verre et le plastique ont été comparés de même qu'un volume de 15 et de 50 mL. Le point positif de ce modèle est qu'il n'y a pas eu de diminution en EC chez les LDL qui n'était pas en présence de cellules Hep G2 en suspension. Par contre, la présence des cellules en suspension n'a pas plus modifié la composition en EC des LDL. Cette soudaine absence de diminution en EC chez les LDL nous a amené à vérifier la présence du récepteur SR-BI chez les cellules Hep G2 adhérentes en comparaison avec les cellules en suspension. Nous avons observé une expression plus faible du SR-BI par les cellules en suspension, qui peut être due à l'effet de la trypsine sur la paroi cellulaire des cellules. Ainsi le modèle *in vitro* n'était pas adéquat.

4.3 Modèle *in vivo*

4.3.1 Chez le rat Sprague Dawley

Le modèle *in vivo* chez le rat a permis de confirmer la captation sélective chez cet animal. Le rat Sprague-Dawley a été sélectionné étant donné sa grande taille qui permet l'injection et la récupération d'une plus grande quantité de LDL. Par la suite, une cinétique a été effectuée pour déterminer le temps optimal d'incubation

des LDL dans l'animal. La figure 10 montre que le temps de 6h donne une diminution en ester de cholestérol plus marquée que le 1 et 3 heures. Par contre, la captation globale diminue de façon importante la quantité de LDL qui est récupérée (Résultats non montrés). Le temps de 3h a donc été conservé afin d'obtenir une quantité suffisante de LDL appauvries.

Par rapport aux essais *in vitro*, la diminution en TG est majeure. En circulation, il y a de la LPL qui hydrolyse les TG des lipoprotéines en acides gras. Afin d'éliminer ce facteur dans l'expérimentation, l'injection de protamine, un inhibiteur de la LPL, 30 minutes avant l'administration de LDL a été effectuée. Il est possible d'affirmer que la LPL est responsable de la diminution en triglycérides étant donné que celle-ci n'est plus observable lorsque la protamine est utilisée. Par contre, la diminution en cholestérol estérifié disparaît elle aussi. La LPL augmenterait donc l'activité de captation sélective. Cette affirmation est supportée par l'étude de Seo *et al.* (2000). Cette étude a démontré que la captation sélective des LDL est augmentée de 3 à 5 fois en présence de LPL chez la lignée cellulaire CHO (chinese hamster ovary cells). Par contre, selon cette étude, l'augmentation de la captation sélective ne serait pas en relation avec l'activité du SR-BI puisque la surexpression de SR-BI dans ces cellules n'augmente pas la captation sélective. Si le SR-BI n'est pas impliqué au niveau de la captation sélective, du moins dans ces cellules, les protéoglycans de la surface cellulaire y tiennent un rôle essentiel. En effet, chez des cellules déficientes en protéoglycans, aucune activité de captation sélective n'est détectable (Seo *et al.* 2000). Dans la même ligne de pensées, la captation sélective est fortement diminuée en présence d'héparine qui dissocie le complexe LPL-LDL des protéoglycans et le traitement des cellules avec du sodium chlorate qui élimine la chaîne glycosaminoglycane des protéoglycans cellulaires inhibe la captation sélective. De plus, l'association entre la LPL et la LDL est aussi essentielle. En effet, la présence d'anticorps anti-LPL, qui rend impossible la liaison entre la LDL et la LPL (Goldberg *et al.* 1986), diminue la captation sélective chez la LDL. Par contre, l'activité catalytique de la LPL ne serait pas en cause car en présence de *tetrahydrolipstatin*, un inhibiteur de

la LPL la captation sélective se poursuit. Ceci nous indique que la diminution en TG n'est pas nécessaire à la voie de captation sélective. Les études précédentes sur la protamine sulfate indiquent que la protamine sulfate occuperait tous les sites de liaison sur la LPL (Hultin *et al.* 1994) empêchant ainsi la liaison entre la LPL et la LDL chez les rats Sprague Dawley. Comme vu précédemment dans l'étude de Seo *et al.* (2000) si la LDL ne peut se lier à la LPL, il ne peut y avoir de captation sélective en utilisant la voie des protéoglycans. Ainsi la captation sélective observée en présence de protamine sulfate serait vraisemblablement causée par l'activité du SR-BI

La comparaison de la charge des différentes LDL a permis de remarquer qu'une seconde population distincte plus chargée est observable dans les échantillons contrôle et modifié chez le rat. Celle-ci n'apparaît pas sur le gel de NDGGE, par contre l'échantillon semble diffus. Il est possible que dans l'échantillon, il y ait une hétérogénéité comme ce que l'on observe avec les sous-classes et que les plus petites LDL aient commencées à s'oxyder en ayant une quantité moindre d'antioxydants que les autres LDL (Tribble *et al.* 2001).

Afin de vérifier le métabolisme de ces LDL, des essais de compétition ont été effectués. Dans le cas de la compétition de LDL natives marquées sur la portion protéique, la figure 13 démontre que les LDL Mod compétitionnent moins efficacement que les LDL natives en présence de HDL₃. La présence des HDL permet le blocage du SR-BI sans nuire à la liaison des LDL au rLDL. Ainsi, il est possible d'observer uniquement l'association au rLDL. Les LDL Mod en compétitionnant moins bien que les LDL natives suggère que l'affinité des LDL mod pour le rLDL est diminuée par rapport à celle des LDL natives. Ceci pourrait concorder avec la diminution en lipides qui cause une diminution de la taille car en effet, une forte diminution de la taille de la LDL diminue son affinité pour le rLDL (Campos *et al.* 1996). De plus, si comme suggéré précédemment, elle est oxydée, ceci aurait aussi comme conséquence de diminuer encore plus l'affinité de la LDL pour le rLDL. Pour ce qui est de la compétition par rapport au contenu

lipidique des LDL, un indicateur de la voie de captation sélective, les LDL Mod compétitionnent beaucoup mieux que les LDL natives sans la présence de HDL₃. Ceci démontre que l'affinité des LDL Mod pour le SR-BI est plus grande que celle des LDL natives. D'ailleurs, plus la LDL est petite, plus elle a de l'affinité pour le SR-BI. De plus, lorsque les essais de compétition sont réalisés en présence de HDL₃, il n'y a pas de différence. S'il n'y a pas de différence par rapport à précédemment, c'est probablement parce que la diminution d'association au rLDL est compensée par une activité de captation sélective supérieure à celle des LDL natives compétitrices. Ceci appuie toujours le fait que la captation sélective est augmentée. Malgré tout le rat n'est pas le modèle idéal étant donné la forte activité de la LPL. Donc, un autre modèle animal devait être utilisé.

4.3.2 Modèle *in vivo* chez la souris C57BL/6

La souris C57BL/6 a été utilisée étant donné que la captation sélective des LDL a été observée chez cet animal à plusieurs reprises (Brodeur *et al.* 2005). Les LDL sont en circulation pour la même période de temps que ce qui a été effectué avec le rat pour permettre la comparaison des différents modèles. La mise en circulation des LDL chez ces souris permet la diminution en EC des LDL, par contre, elle n'est pas suffisamment grande pour être différente significativement. Il faut donc trouver un autre modèle plus valable. Par rapport à ce qui a été observé chez le rat, les souris C57BL/6 ont l'avantage de causer une diminution moins marquée des TG composant la LDL. Par contre, la petite taille de ces souris implique l'utilisation d'une grande quantité d'individus afin de récolter une quantité suffisante de LDL pour effectuer les tests de caractérisation.

4.3.3 Modèle *in vivo* chez la souris CD1

La figure 16 a permis de démontrer l'occurrence de captation sélective chez la souris CD1. Celle-ci étant plus grosse que la souris C57BL/6, le nombre d'individu utilisé peut être diminué et permet l'obtention d'une bonne quantité de LDL. Une diminution significativement différente des EC est observée chez les LDL qui ont circulé 3 heures dans la souris (Mod) par rapport aux LDL natives.

Malheureusement, le contrôle qui consistait en la conservation des LDL dans le plasma d'un animal à 37°C pour 3 heures, est aussi différent des LDL natives. La charge des LDL contrôles a été grandement augmentée, ce qui peut indiquer un début d'oxydation. D'ailleurs, pour ce qui est des LDL modifiées chez la souris, elles sont légèrement plus chargées par rapport aux natives. Les essais de susceptibilité à l'oxydation ont permis de démontrer une saturation de l'oxydation plus rapide pour le contrôle que pour les LDL modifiées chez la souris. Étant donné que leurs niveaux de lipides sont semblables, l'atteinte d'un plateau plus rapidement chez le contrôle pourrait indiquer un début d'oxydation au sein de la LDL, ce qui vient supporter l'interprétation du gel d'agarose-barbital. Pour ce qui est des LDL Mod, le plateau atteint plus rapidement pourrait indiquer que la peroxydation des lipides est effectuée plus rapidement, étant donné la quantité moindre de lipides par rapport à celle des LDL natives ou encore la présence d'un début d'oxydation. Vu la présence d'oxydation chez les LDL contrôles, le métabolisme des LDL modifiées chez la souris par des cellules Hep G2 a été comparé à celui des LDL natives. Nos résultats ont démontré une diminution certaine de leur métabolisme passant par le rLDL. En effet, leur association protéique est plus faible que celles des LDL natives, et cela de manière significative. La même chose est observable au niveau de la dégradation protéique. Par contre, l'association lipidique est plus grande de même que la captation sélective. Deux choix s'imposent : soit la LDL est trop petite, ce qui diminue son affinité pour le rLDL et le récepteur SR-BI compense en augmentant la voie de captation sélective ; soit la LDL a un début d'oxydation, ce qui diminue toujours son affinité pour le rLDL et augmente l'affinité pour le SR-BI étant donné que le récepteur SR-BI a plus d'affinité pour des LDLox (Rhainds *et al.* 1999). Ce modèle n'est toujours pas optimal, mais semble mieux que les deux autres. Par contre le contrôle reste à être repensé.

CONCLUSION

Les sous-classes de LDL semblent démontrer qu'une diminution en EC est bénéfique pour la captation globale ce qui confirme notre hypothèse. Par contre, les modèles utilisés suggèrent qu'une déplétion en EC s'accompagne d'une diminution du métabolisme passant par le rLDL et une augmentation du métabolisme passant par le SR-BI. Il semblerait aussi que la déplétion en EC facilite l'oxydation des LDL, ce qui est néfaste pour l'organisme étant donné que des LDL oxydées sont souvent la source du développement des plaques athérosclérotiques. Étant donné que les études démontrent que le SR-BI est bénéfique pour l'organisme, il est possible que l'impact de son action ne soit pas nécessairement sur la LDL, mais que d'autres joueurs soient impliqués dans le processus.

BIBLIOGRAPHIE

ABUMRAD, N., EL-MAGHRABI, M.R., AMRI, E.Z., LOPEZ, E., et GRIMALDI, P.A. 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids this is induced during preadipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **268**: 17665-17668.

ACTON, S.L., RIGOTTI, A., LANDSCHULTZ, K.T., XU, S., HOBBS, H.H., et KRIEGER, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**: 518-520.

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

ALABAKOVSKA, S., LABUDOVIC, D., TOSHESKA, K., SPIROSKI, M., et TODOROVA, B. 2004. Distribution of low density lipoprotein subclasses in Macedonian children. *Med. Sci. Monit.* **10**: 667-671.

ALAUPOVIC, P. 1991. Apolipoprotein composition as the basis for classifying plasma lipoproteins. Characterization of ApoA- and ApoB-containing lipoprotein families. *Prog. Lipid Res.* **30**: 105-138.

ARAI, T., WANG, N., BEZOUJEVSKY, M., WELCH, C., et TALL, A.R. 1999. Decreased atherosclerosis in heterozygous LDL lipoprotein receptor deficient mice expressing the SR-BI transgene. *J. Biol. Chem.* **274**: 2366-2371.

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

BERLINER, J.A., TERRITO, M., SEVANIAN, A., RAMIN, S., KIM, J.A., RAMSHAD, B., ESTERSON, M. et FOGELMAN, A.M. 1990. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J. Clin. Invest.* **85**:1260-1266.

BERNEIS, K.K., et KRAUSS, R.M. 2002. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J. Lipid Res.* **43**: 1363-1379.

BJÖRKEGREN, J., KARPE, F., MILNE, R.W., et HAMSTEN, A. 1998. Differences in apolipoprotein and lipid composition between human chylomicron remnants and very low density lipoproteins isolated from fasting and postprandial plasma. *J. Lipid Res.* **39**: 1412-1420.

BOTHAM, K.M., et BRAVO, E. 1995. The role of lipoprotein cholesterol in biliary lipid secretion: studies with in vivo experimental models. *Prog. Lipid Res.* **34** : 71-97.

BRAUN, A., TRIGATTI, B.L., POST, M.J., SATO, K., SIMONS, M., EDELBERG, J.M., ROSENBERG, R.D., SCHRENZEL, M. et KRIEGER, M. 2002. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ. Res.* **22**: 270-276.

BRAUN, A., ZHANG, S., MIETTINEN, H.E., EBRAHIM, S., HOLM, T.M., VASILE, E., POST, M.J., YOERGER, D.M., PICARD, M.H., KRIEGER, J.L., ANDREWS, N.C., SIMONS, M. et KRIEGER, M. 2003. Probucol prevents early coronary heart disease and death in the high-density lipoprotein receptor SR-BI apolipoprotein E double knockout mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **12** : 7283-7288.

BRISSETTE, L., CHAREST, M.-C., et FALSTRAULT, L. 1996. Selective uptake of cholesteryl esters of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein-binding site in Hep G2 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. et TRUONG, T.Q. 1999. Selective uptake of cholesteryl esters from various classes of lipoproteins by Hep G2 cells. *Biochem. Cell Biol.* **77**: 157-163.

BRISSETTE, L. et FALSTRAULT, L. 1994. Analysis of the selective uptake of the cholesteryl ester of human intermediate density lipoproteins by Hep G2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1213**: 5-13.

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

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

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

BROWN, M.S., et GOLDSTEIN, J.L. 1975. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell* **6**: 307-316.

BROWN, W.V et BAGINSKY, M.L. 1972. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 375-382.

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

CALVO, D., GOMEZ-CORONADO, D., SUAREZ, Y., LASUNCION, M.A., et VEGA, M.A. 1998. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL and VLDL. *J. Lipid Res.* **39**: 777-788.

CALVO, D., et VEGA, M.A. 1993. Identification, primary structure and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J. Biol. Chem* **268**: 18929-18935.

CAMPOS, H., ARNOLD, K.S., BALESTRA, M.E., INNERARITY, T.L. et KRAUSS, R.M. 1996. Differences in receptor binding of LDL subfractions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**: 794-801.

CAMPOS, H., PERLOV, D., KHOO, C., et 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.

CAMPOS, H., BLIJLEVENS, E., MCNAMARA, J.R., ORDOVAS, J.M., POSNER, B.M., WILSON, P.W.F., CASTELLI, W.P., et SCHAEFER, E.J. 1992. LDL particle size distribution results from the Framingham offspring study. *Arterioscler. Thromb.* **12**: 1410-1419.

CAO, G., GARCIA, C.K., WYNE, K.L., SCHULTZ, R.A., PARKER, K.L., et HOBBS, H.H. 1997. Structure and localization of the human gene encoding SRBI/CLA-1. *J. Biol. Chem.* **272**: 33068-33076.

CARDIN, A.D., PRICE, C.A., HIROSE, N., KRIVANEKI, M.A., BLANKENSHIPI, D.T., CHAOLL, J. et MAOILL, S.J.T. 1986. Structural Organization of apolipoprotein B-100 of human plasma low density lipoproteins. comparison to B-48 of chylomicrons and very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **261**: 16744-16748.

CHAN, L., CHANG, B.H.J., NAKAMUTA, M., LI, W.H. et SMITH, L.C. 1997. Apobec-1 and apolipoprotein B mRNA editing. *Biochim. Biophys. Acta* **1345**: 11-26.

CHAPMAN, M. J., et J. P. KANE. 1975. Stability of the apoprotein of human serum low density lipoprotein: absence of endogenous endopeptidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**: 1030-1036.

COMINACINI, L., PASINI, A.F., GARBIN, U., DAVOLI, A., TOSETTI, M.L. et CAMPAGNOLA, M. 2000. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **28**: 12633–12638.

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

DEACON, A.C., et DAWSON, N.P. 1979. Enzymic assay of total cholesterol involving chemical or enzymic hydrolysis—a comparison of methods. *Clin. Chem.* **25**: 976–984.

DEEB, S.S., ZAMBON, A., CARR, M.C., AYYOBI, A.F. et BRUNZELL, J.D. 2003. Hepatic lipase and dyslipidemia: interactions among genetic variants, obesity, gender, and diet. *J. Lipid Res.* **44**: 1279-1286.

DE ROOS, B., CASLAKE, M.J., MILLINER, K., BENSON, G.M., SUCKLING, K.E., et PACKARD, C.J. 2005. Characterisation of the lipoprotein structure in the St. Thomas' Mixed Hyperlipidaemic (SMHL) rabbit. *Atherosclerosis* **181**: 63–68.

DE WINTHER, M.P.J., KANTERS, E., KRAAL, G., et HOFKER, M.H. 2005. Nuclear Factor κ B signalling in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**: 904-914.

EISENBERG, S. 1984. High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* **25**: 1017-1058.

EISENBERG, S., et SCHURR, D. 1976. Phospholipid removal during degradation of rat plasma very low density lipoprotein in vitro. *J. Lipid Res.* **17**: 578-587.

EISENBERG, S., SCHURR, D., GOLDMAN, H., et OLIVECRONA, T. 1978. Comparison of the phospholipase activity of bovine milk lipoprotein lipase against rat plasma very low density and high density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **531**: 344-351.

ENDEMANN, G., STANTON, L.W., MADDEIN, K.S., BRYANT, C.M., WHITE, R.T. et POTTER A.A. 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **268**: 11811-11816.

ESPENSHADE, P.J., LI, W.P. et YABE, D. 2002. Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11694-11699.

FEBBRAIO, M., ABUMRAD, N. A., HAJJAR, D. P., SHARMA, K., CHENG, W. et PEARCE, S. F. 1999. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* **274**: 19055-19062.

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

FEBBRAIO, M. et SILVERSTEIN, R.L. 2007. CD36: implications in cardiovascular disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 2012-2030.

FENSKE, D., DERSCH, K., LUX, C., ZIPSE, L., SURIYAPHOL, P., DRAGNEVA, Y., HAN, S.R., BHAKDI, S. et HUSMANN, M. 2008. Enzymatically hydrolyzed low-density lipoprotein modulates inflammatory responses in endothelial cells. *Thromb. Haemost.* **100**: 1146-1154.

FIELDING, C.J., SHORE, V.G., et FIELDING, P.E. 1972. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 1493-1498.

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

GOLDBERG, I.J., PATERNITI, J.R. Jr., FRANCE, D.S., MARTINELLI, G. et CORNICELLI, J.A. 1986. Production and use of an inhibitory monoclonal antibody to human lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **878**: 168-176

GOLDSTEIN, J.L., HO, Y.K., BASU, S.K. et BROWN, M.S. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 333-337.

GREEN, S.R., et 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., et JAMIESON, G.A. 1992. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction and transfusion medicine. *Blood* **80**: 1105-1115.

GUÉRIN, M., DOLPHIN, P.J., et CHAPMAN, M.J. 1994. A new In Vitro method for the simultaneous evaluation of cholesteryl ester exchange and mass transfer between HDL and apoB-containing lipoprotein subspecies: Identification of preferential cholesteryl ester acceptors in human plasma. *Arterioscler. Thromb.* **14**: 199-206.

HABERLAND, M. E., FOGELMAN, A.M., et EDWARDS, P.A. 1982. Specificity of receptor-mediated recognition of malondialdehyde-modified low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1712-1716.

HAMILTON, R.L., WONG, J.S., CHAM, C.M., NIELSEN, L.B., et YOUNG, S.G. 1998. Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. *J. Lipid Res.* **39**: 1543-1557.

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

HAUSER, H., DYER, J.H. et NANDY, A. 1998. Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry* **37**: 17843-17850.

HAVEL, R.J., FIELDING, C.J., OLIVECRONA, T., SHORE, V.G., FIELDING, P.E. et EGELRUD, T. 1973. Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources. *Biochemistry* **24**: 1828-1833.

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

HAVEL, R.J., SHORE, V.G., SHORE, B., et BIER, D.M. 1970. Role of specific glycopeptides of human serum lipoproteins in the activation of lipoprotein lipase. *Circ. Res.* **27**: 595-600.

HEINECKE, J.W., ROSEN, H., et CHAIT, A. 1987. Iron and copper promote modification of low-density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J. Clin. Invest.* **74**: 1890-1894.

HELLER, M., STADLER, D., SCHLAPPRITZIL, E., HAYN, G., MATTER, U. et HAERBERLI, A. 2005. Mass spectrometry-based analytical tools for the

molecular protein characterization of human plasma lipoproteins. *Proteomics* **5**: 2619-2630.

HOEFNER, D.M., HODEL, S.D., O'BRIEN, J.F., BRANUM, E.L., SUN, D., MEISSNER, I., et MCCONNELL, J.P. 2001. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the quantimetrix lipoprint LDL system. *Clin. Chem.* **47**: 266-274.

HORTON, J.D. 2002. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 1091-1095.

HULTIN, M., OLIVECRONA, G. et OLIVECRONA, T. 1994. Effect of protamine on lipoprotein lipase and hepatic lipase in rats. *J. Biochem.* **304**: 959-966

INNERARITY, T.L., BERSOT, T.P., ARNOLD, K., WEISGRABER, K.H., DAVIS, P.A., FORTE, T.M., et MAHLEY, R.W. 1984. Receptor binding activity of high density lipoproteins containing apoprotein E from abetalipoproteinemic and normal neonate plasma. *Metabolism* **33**: 186-195.

JONAS, A. 2000. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**: 245-256.

JONAS, A., SWEENEY, S.A., et HERBERT, P.N. 1984. Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **259** : 6369-6375.

JURGENS, G., HOFF, H.F., CHISOLM III, G.M., et ESTERBAUER, H. 1987. Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation: characterization and pathophysiological implications. *Chem. Phys. Lipids* **45**: 315-316.

JURGENS, G., LANG, J. et ESTERBAUER, H. 1986. Modifications of human low density lipoprotein by the lipid peroxidation product 4-hydroxy nonenal. *Biochim. Biophys. Acta* **875**: 103-114.

KNECHT, T.P., et 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.

KOCHER, O., YESILALTAY, A., SHEN, C.H., ZHANG, S., DANIELS, K., PAL, R., CHEN, J. et KRIEGER, M. 2008. Influence of PDZK1 on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**: 310-316.

KÖNIG, B., KOCH, A., SPIELMANN, J., HILGENFELD, C., STANGL, G.I. et EDER, K. 2007. Activation of PPAR α lowers synthesis and concentration of cholesterol by reduction of nuclear SREBP-2. *Biochem. Pharma.* **73**: 574-585.

KOZARSKY, K.F., DONAHEE, M.H., GLICK, J.M., KRIEGER, M. et RADER, D.J. 2000. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 721-727.

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

KRAUSE, B.R., SLOOP, C.H., CASTLE, C.K., et ROHEIM, P.S. 1981. Mesenteric lymph apolipoproteins in control and ethinyl estradiol-treated rats: a model for studying apolipoproteins of intestinal origin. *J. Lipid Res.* **22**: 610-619.

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

KRIEGER, M. 1997. The other side of scavenger receptors: Pattern recognition for host defense. *Curr. Opin. Lipidol.* **8** : 275-280.

LANGER, T., STROBER, W. et LEVY, R.I. 1972. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* **51**: 1528-1536.

LAROSA, J.C., LEVY, R.I., HERBERT, P., LUX, S.E., et FREDRICKSON, D.S. 1970. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **41**: 57-62.

LI, D., et MEHTA, J.L. 2005. Oxidized LDL, a critical factor in atherogenesis. *Cardio Res.* **68**: 353-354.

LI, D., et MEHTA, J.L. 2000. Antisense to endothelial ox-LDL receptor LOX-1 inhibits ox-LDL-mediated upregulation of MCP-1 expression and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* **101**: 2889-2896.

LI, D., et MEHTA, J.L. 2000. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 1116-1122.

LI, Y.S., SHYU, Y.J., WRIGHT, J.G., VALENTE, A.J., CORNHILL, J.F., et KOLATTUKUDY, P.E. 1993. The expression of monocyte chemotactic protein

(MCP-1) in human vascular endothelium in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biochem.* **126**: 61-68.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., et RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

LOUGHEED, M. et STEINBRECHER, U.P. 1996. Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J. Biol. Chem.* **271**: 11798-11805.

MAENO, Y., FUJIOKA, H., HOLLINGDALE, M.R., OCKENHOUSE, C.F., NAKASAWA, S., et AIKAWA, M. 1994. Ultrastructural localization of CD36 in human hepatic sinusoidal lining cells, hepatocytes, human hepatoma (Hep G2-A16) cells and C32 amelanotic menoma cells. *Exp. Parasitol.* **79**: 383-430.

MAGGI, E., CHIESA, R., MELISSANO, G., CASTELLANO, R., ASTORE, D., GROSSI, A., FINARDI, G., et BELLOMO G. 1994. LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis a study of in vitro and in vivo oxidation markers. *Arterioscler. Thromb.* **14**: 1892-1899.

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

MAHLEY, R.W., INNERARITY, T.L., RALL, S.C. JR., et WEISGRABER, K.H. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* **25**: 1277-1294.

MALLOY, M.J., et KANE, J.P. 1982. Hypolipidemia. *Med. Clin. North Am.* **66**: 469-484.

MARGOLIS, S., et LANGDON, R.G. 1966. Studies of human serum beta-lipoprotein. I. Amino acid composition. *J. Biol. Chem.* **441**: 469-476.

MCFARLANE, A. S. 1948. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature (London)* **182**: 53-54.

MERKEL, M., WEINSTOCK, P.H., CHAJEK-SHAUL, T., RADNER, H., YIN, B., BRESLOW, J.L. et GOLDBERG, I.J. 1998. Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. *J. Clin. Invest.* **102**: 893-901

MITZUTANI, T., SONODA, Y., MINEGISHI, T., WAKABAYASHI, K., et 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.

- NESTEL, P.J., et FIDGE, N.H. 1982. Apoprotein C metabolism in man. *Adv. Lipid Res.* **19**: 55-83.
- NICHOLSON, A., PEARCE, S.F.A., SILVERSTEIN, R. 1995. Oxidized LDL binds to CD36 on monocyte-derived macrophages and transfected cell lines: evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as a binding site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 269-275.
- NIGON, F., LESNIK, P., ROUIS, M., et CHAPMAN, M.J. 1991. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J. Lipid Res.* **32**: 1741-1753.
- PARTHASARATHY, S., et BARNETT, J. 1990. Phospholipase A2 activity of low density lipoprotein: evidence for an intrinsic phospholipase A2 activity of apoprotein B-100. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9741-9745.
- PARTHASARATHY, S., FONG, L.G., OTERO, D., et STEINBERG, D. 1987. Recognition of solubilized apoproteins from delipidated, oxidized low density lipoprotein (LDL) by the acetyl-LDL receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 537-540.
- PARTHASARATHY, S., WIELAND, E., et STEINBERG, D. 1989. A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1046-1050.
- PETROVIC, N., GROVE, C., LANGTON, P.E., MISSO, N.L.A., et THOMPSON, P.J. 2001. A simple assay for a human serum phospholipase A2 that is associated with high-density lipoproteins. *J. Lipid Res.* **42**: 1706-1713.
- PITTMAN, R.C., KNECHT, T.P., ROSENBAUM, M.S., et 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.
- PLATT, N. et GORDON, S. 1998. Scavenger receptors: Diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands. *Chem. Biol.* **5**: 193-203.
- RANKIN, S.M., PARTHASARATHY, A., et STEINBERG, D. 1991. Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages. *J. Lipid Res.* **32**: 449-456.
- RHAINDS, D., BOURGEOIS, P., BOURRET, G., HUARD, K., FALSTRAULT L., et BRISSETTE, L. 2004. Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of Hep G2 cells. *J. Cell Sci.* **117**: 3095-3105.
- RHAINDS, D., BRODEUR, M., LAPOINTE, J., CHARPENTIER, D., FALSTRAULT, L., et BRISSETTE, L. 2003. The role of human and mouse

hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl esters. *Biochemistry* **42**: 7527-7538.

RHAINDS, D., et BRISSETTE, L. 1999. Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* **31**: 915-931.

RHAINDS, D., FALSTRAULT, F., TREMBLAY, C., et BRISSETTE, L. 1999. Uptake and fate of class B scavenger receptor ligands in Hep G2 cells. *Eur. J. Biochem.* **261**: 227-235.

RIGOTTI, A., TRIGATTI, B.L., PENMAN, M., RAYBURN, H., HERZ, J. et KRIEGER, M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**: 12610-12615.

ROBERTS, D.C., MILLER, N.E., PRICE, S.G., CROOK, D., CORTESE, C., LA VILLE, A., MASANA, L. et Lewis, B. 1985. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro. *J. Biochem.* **226**: 319-322.

RUSSELL, D.W., YAMAMOTO, T., SCHNEIDER, W.J., SLAUGHTER, C.J., BROWN, M.S., et GOLDSTEIN, J.L. 1983. cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: Feedback regulation of a receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 7501-7505.

SAUCIER, S.E., KANDUTSCH, A.A., GAYEN, A.K., SWAHN, D.K., et SPENCER, T.A. 1989. Oxysterols regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in liver. *J. Biol. Chem.* **264**: 6863-6869.

SAWAMURA, T., KUME, N., AOYAMA, T., MORIWAKI, H., HOSHIKAWA, H., et ARIBA, Y. 1997. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* **886**: 73-77.

SCHNEIDER, W.J., BEISIEGEL, U., GOLDSTEIN, J.L., et BROWN, M.S. 1982. Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J. Biol. Chem.* **257**: 2664-2673.

SEO, T., AL-HAIDERI, M., TRESKOVA, E., WORGALL, T.S., NAKO, Y., GOLDBERG, I.J. et DECKELBAUM, R.J. 2000. Lipoprotein lipase-mediated selective uptake from low density lipoprotein requires cell surface proteoglycans and is independent of scavenger receptor class B type 1. *J. Biol. Chem.* **275**: 30355-30362.

SILVER, D. L., WANG, N., XIAO, X. and 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.

STEINBERG, D., PARTHASARATHY, S., CAREW, T.E., KHOO, J.D., et WITZTUM, J.L. 1989. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320**: 915-924.

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

TENG, B., THOMPSON, G.R., SNIDERMAN, A.D., FORTEO, T.M., KRAUSS, R.M., et KWITEROVICH, P.O. JR. 1983. Composition and distribution of low density lipoprotein fractions in hyperapobetalipoproteinemia, normolipidemia, and familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 6662-6666.

TRIBBLE, D. L. 1995. Lipoprotein oxidation in dyslipidemia: insights into general mechanisms affecting lipoprotein oxidative behavior. *Curr. Opin. Lipidol.* **6**: 196-208.

TRIBBLE, D.L., RIZZO, M., CHAIT, A., LEWIS, D.M., BLANCHE, P.J. et KRAUSS, R.M. 2001. Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low density lipoproteins. *Am. J. Med.* **110**: 264-275.

TRUONG, T.Q., AUBIN, D., BOURGEOIS, P., FALSTRAULT, L. et BRISSETTE, L. 2006. Opposite effect of caveolin-1 in the metabolism of high-density and low-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**: 24-36.

UGAWA, T., KAKUTA, H., MORITANI, H., INAGAKI, O. et SHIKAMA, H. 2003. YM-53601, a novel squalene synthase inhibitor, suppresses lipogenic biosynthesis and lipid secretion in rodents. *Br. J. Pharmacol.* **139**: 140-146.

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. et 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. USA* **95**: 4077-4080.

WANG, N., ARAI, T., JI, Y., RINNINGER, F. et TALL, A.R. 1998. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **273**: 32920-32926.

WINDLER, E.E.T., KOVANEN, P.T., CHAO, Y.-S., BROWN, M.S., HAVEL, R.J., et GOLDSTEIN, J.L. 1980. The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of

rat liver. A binding site that mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J. Biol. Chem.* **255**: 10464-10467.

WITZTUM, J.L., et STEINBERG, D. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis, *J. Clin. Invest.* **88**: 1795-1792.

WU, A-L., et WINDMUELLER, H.G. 1979. Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. *J. Biol.Chem.* **254**: 7316-7322.

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

YABE, D., BROWN, M.S. et GOLDSTEIN, J.L. 2002. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element binding proteins. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* **99**: 12753-12758.

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.

ZANNIS, V.I., BRESLOW, J.L., et KATZ, A.J. 1980. Isoproteins of human apolipoprotein A-I demonstrated in plasma and intestinal organ culture. *J. Biol. Chem.* **255**: 8612-8617.

ZANNIS, V.I., KUMIT, D.M., et BRESLOW, J.L. 1982. Hepatic apo-A-I and apo-E and intestinal apoA-1 are synthesized in precursor isoprotein forms by organ cultures of human fetal tissues. *J. Biol. Chem.* **257**: 536-544.

ZHONG, S., LIU, C., HAVILAND, D., DORIS, P.A. et TENG, B.B. 2006. Simultaneous expression of apolipoprotein B Mrna editing enzyme and scavenger receptor BI mediated by a therapeutic gene expression system. *Atherosclerosis* **184**: 264-275.