

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT DU PROFIL LIPIDIQUE MATERNEL SUR
L'EXPRESSION DES APOLIPOPROTÉINES DANS LE
PLACENTA HUMAIN À TERME

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
LAURENT PERRIER

FEVRIER 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

Au Dre Julie Lafond de l'université du Québec à Montréal,
Pour son accueil au sein du laboratoire de physiologie materno-fœtale et pour m'avoir permis de travailler sur ce projet sous sa direction.

À Lucie Simoneau,
Assistante de recherche du laboratoire,
Pour son amitié, sa bonne humeur, son soutien et ses conseils judicieux tout au long de ma maîtrise.

Au Dr Georges Daoud,
Pour son amitié, son esprit critique et ses conseils utiles pour la réalisation de mon projet, autant sur le plan théorique que technique.

À tous les membres de l'équipe du laboratoire pour leur soutien pendant ces deux années.

À toute ma famille, mes amis et tous ceux que j'oublie....

Je dédie ce mémoire à mes parents, ma sœur, mes grands-parents et à toutes les personnes qui m'ont soutenu tout le long de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
LISTE DES SIGLES, ACRONYMES ET SYMBOLES	ix
Résumé	x
INTRODUCTION	1
1. CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES	4
1.1. Le placenta	4
1.1.1. Formation du placenta	4
1.1.2. Production hormonale placentaire	5
1.1.2.1. L'hormone chorionique gonadotrope	5
1.1.2.2. Les hormones stéroïdiennes	5
1.1.2.3. L'insuline	6
1.1.3. Les échanges mère fœtus	7
1.1.3.1. Transport du calcium	7
1.1.3.2. Transport des acides aminés	8
1.1.3.3. Transport du glucose	9
1.1.3.4. Transport des lipides	9
1.2. Le métabolisme du cholestérol	11
1.2.1. Le cholestérol	11
1.2.2. Cholestérol endogène	12
1.2.3. Le transport du cholestérol par le placenta	14
1.3. Les apolipoprotéines	15
1.3.1. L'apolipoprotéine A-1	15
1.3.1.1. Régulation de l'apolipoprotéine A-1	16
1.3.1.2. Fonctions de l'apolipoprotéine A-1	17

1.3.2. L'apolipoprotéine B	18
1.3.2.1. Régulation de l'apolipoprotéine B	19
1.3.2.2. Fonctions de l'apolipoprotéine B	20
1.3.3. L'apolipoprotéine E	21
1.3.3.1. Régulation de l'apolipoprotéine E	22
1.3.3.2. Fonctions de l'apolipoprotéine E	23
1.3.4. Les autres apolipoprotéines	25
1.3.4.1. L'apolipoprotéines A-II	25
1.3.4.2. Les apolipoprotéines C	25
1.3.4.3. L'apolipoprotéine D	26
1.3.4.4. Les apolipoprotéines L	27
1.4. Buts du projet	28
2. CHAPITRE II : ARTICLE	29
2.1. Contributions	29
2.2. Page de présentation	30
2.3. ABSTRACT	31
2.4. INTRODUCTION	32
2.5. MATERIALS AND METHODS	34
2.6. ACKNOWLEDGMENTS	37
2.7. RESULTS	38
2.8. DISCUSSION	40
2.9. REFERENCES	43
2.10. FIGURE LEGENDS	49
2.11. FIGURES	50
3. CHAPITRE III : DISCUSSION ET CONCLUSION	56
4. CHAPITRE IV : BIBLIOGRAPHIE	59

LISTE DES FIGURES

Page 53

Figure 1.A: Effect of maternal total cholesterol level on human placental ApoA-I mRNA.
B: Effect of maternal total cholesterol level on human placenta ApoA-I.

Page 54

Figure 2.A: Effect of maternal total cholesterol level on human placental ApoB mRNA.
B: Effect of maternal total cholesterol level on human placenta ApoB.

Page 55

Figure 3.A: Effect of maternal total cholesterol level on human placental ApoE mRNA.
B: Effect of maternal total cholesterol level on human placenta ApoE.

LISTE DES TABLEAUX

Page 50

Table I: Apolipoprotein primers designed for real time PCR assays.

Page 51

Table II: Clinical and biochemical characteristics of the studied population according classification for mother's plasma cholesterol level.

Page 52

Table III: Associations of placental apolipoproteins ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue) with clinical and biochemical variables in mothers, newborns and placentas.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

7-OHChol	Cholestérol 7- α -hydroxylase
ABCA1	Transporteur avec domaine liant l'ATP de type A1
ACAT	Acétylcoenzyme A cholestérol acétyltransférase
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Apo	Apolipoprotéine
ATP	Adénosine triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BCA	Acide bicinchoninique
BMI	Indice de masse corporelle
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CaBP	Protéine de transport du calcium
C/EBP	Protéine activatrice de la séquence CCAAT
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol
CHUM	Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
CHUQ	Centre Hospitalier Universitaire de Québec
ELISA	Dosage immuno-enzymatique
GLUT	Transporteur de glucose
gp330	Glycoprotéine 330
FABP	Protéines de transport des acides gras
HC	Cholestérol total supérieur à la médiane
hCG	Hormone chorionique gonadotrope
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HDL-C	Cholestérol total associé aux HDL
HL	Lipase hépatique
HMG-CoA-réductase	3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase
HNF	Facteur de transcription nucléaire hépatique
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire

IGF	Facteur de croissance semblable à l'insuline
IRCE	Élément de réponse à l'insuline
LC	Cholestérol total inférieur à la médiane
LCAT	Acyltransférase de cholestérol par la lécithine
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LDL-C	Cholestérol total associé aux LDL
LDLR	Récepteur aux LDL
LOX-1	Récepteur aux LDL oxydées de type 1
LPL	Lipoprotéine lipase
LRP	Récepteur apparenté au récepteur aux LDL
LXR	Récepteur X du foie
MTP	Protéine microsomale de transfert des triglycérides
Pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PGH	Hormone de croissance placentaire
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PPAR	Récepteur activant la prolifération des péroxysomes
PTHrP	Peptide apparenté à l'hormone parathyroïdienne
RIA	Dosage radio-immunologique
RXR	Récepteur X des rétinoïdes
SD	Erreur standard
SEM	Erreur standard des moyennes
SR-B1	Récepteur éboueur de classe B type 1
SRE	Élément de réponse aux stéroïdes
SREBP	Protéine de liaison au SRE
TC	Cholestérol total
TMB	benzidine tétraméthylée
Tris-HCl	Tris (hydroxyméthyl)aminoéthane
VLDL	Lipoprotéines de très faible densité

LISTE DES SIGLES, ACRONYMES ET SYMBOLES

° C	Degrés Celsius
<	Inférieur
Da	Dalton
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
mg	Milligramme
mM	Millimolaire
n	Nombre de sujets dans le groupe
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
<i>p</i>	Probabilité d'erreur
r	Coefficient de corrélation
±	Plus ou moins
%	Pourcentage
®	Marque déposée

Résumé

L'hypercholestérolémie et la forme pathologique qui en résulte, l'athérosclérose, sont fréquemment impliquées dans les accidents cardiovasculaires, actuellement première cause de mortalité dans les pays développés. L'hypercholestérolémie se caractérise par un taux anormalement élevé de cholestérol dans le sang. Le taux de cholestérol sanguin dépend principalement de l'équilibre entre les lipoprotéines de faible densité, les LDL et les lipoprotéines de hautes densités, les HDL. Les apolipoprotéines A-I, B et E (apoA-I, apoB et apoE respectivement) sont les éléments essentiels de la structure des lipoprotéines. Des altérations du métabolisme des apolipoprotéines sont associées à l'hypercholestérolémie et au développement de l'athérosclérose chez l'adulte. Cependant, plusieurs études ont montré que l'athérosclérose pouvait se développer à un âge plus précoce, pendant la période de vie fœtale. Il est alors légitime de penser que le métabolisme des apolipoprotéines pendant la grossesse pourrait être impliqué dans le développement de l'athérosclérose au niveau fœtal. Les macromolécules comme les lipoprotéines ne peuvent traverser le placenta librement. La synthèse d'apolipoprotéines par le placenta est donc indispensable pour fournir le cholestérol au fœtus. Comme la grossesse est caractérisée par une élévation du cholestérol maternel, l'étude de l'expression des apolipoprotéines placentaires suivant le taux de cholestérol maternel est indispensable pour déterminer leur implication dans l'athérosclérose au niveau fœtal. Pour réaliser ce projet, à partir de placentas humains prélevés à l'accouchement, l'expression génétique de l'apoA-I, l'apoB et de l'apoE a été évaluée dans le tissu par la technique de polymérisation en chaîne en temps réel. Puis, la concentration tissulaire en protéine a été déterminée par dosage immuno-enzymatique. Nos résultats ont montré que les mères ayant un taux de cholestérol élevé avaient également une augmentation de cholestérol associé aux LDL et d'apoB dans leur circulation. Dans le placenta, l'hypercholestérolémie maternelle n'affecte ni la transcription des gènes ni les concentrations tissulaires de l'apoA-I et de l'apoE. L'absence de régulation de l'apoA-I et de l'apoE placentaires par le cholestérol maternel est surprenante, cependant, l'exacerbation du système endocrinien pendant la grossesse, notamment des hormones stéroïdiennes, pourrait avoir une influence sur l'expression des apolipoprotéines dans le placenta. Par contre, l'apoB est régulée à la hausse dans le placenta des mères hypercholestérolémiques. Un des mécanismes probable de cette régulation pourrait être l'augmentation, par le cholestérol, de l'activité de la protéine microsomale de transfert des triglycérides. Cette protéine est un élément essentiel dans la régulation de l'expression de l'apoB. De plus, l'augmentation de l'apoB est corrélée au cholestérol total maternel et à la concentration d'apoB dans la circulation maternelle et fœtale. Ces résultats suggèrent que l'excès de cholestérol maternel est incorporé majoritairement dans les LDL sans affecter le métabolisme des HDL. Cette étude suggère un rôle potentiel de l'apoB placentaire dans le développement de l'athérosclérose au niveau fœtal.

Mots clés : Placenta, grossesse, apolipoprotéines, lipides, profil lipidique

INTRODUCTION

L'hypercholestérolémie se définit par une concentration élevée de cholestérol dans le sang. La forme pathologique de l'hypercholestérolémie se nomme l'athérosclérose. Elle est caractérisée par le développement de l'athérome, ou plaque athéromateuse, constitué d'une accumulation anormale de lipides et de cholestérol sur la paroi des artères (Bobryshev, 2006). La multiplication et la croissance de ces plaques provoquent l'obstruction des vaisseaux. À long terme, l'athérosclérose peut conduire à des accidents vasculaires, actuellement première cause de mortalité dans les pays développés. L'association entre l'athérosclérose et les accidents vasculaires est très fréquente (Braunwald, 1997).

Du fait des coûts démographiques et socio-économiques importants engendrés par l'athérosclérose, la lutte contre cette pathologie est indispensable. Cette lutte commence par une meilleure connaissance de ses origines. Outre le surplus pondéral, résultant de la sédentarisation des populations (Lakka et al., 2001), d'autres facteurs, comme le régime alimentaire (Negis et al., 2006), peuvent avoir leur importance. De plus, l'hérédité, donc la prédisposition génétique, peut être une variable favorisant le développement de l'athérosclérose. En effet, les jeunes adultes atteints d'hypercholestérolémie familiale ont de fortes prédispositions au développement de plaques athéromateuses (Hoeg et al., 1994; Spengel et al., 1988). Plus récemment, il semblerait que l'athérosclérose puisse se déclarer encore plus tôt qu'à l'adolescence, directement au niveau du fœtus (Palinski and Napoli, 2002).

La programmation fœtale est une théorie soutenant que l'influence de l'environnement du fœtus pendant la grossesse peut avoir des conséquences sur la vie fœtale, l'accouchement, le nouveau-né et aussi sur la vie adulte. En effet, une hypercholestérolémie maternelle chez le hamster affecte l'homéostasie du cholestérol chez le fœtus (McConihay et al., 2001). En ce qui concerne l'athérosclérose, une étude, réalisée chez le lapin, a montré qu'un apport lipidique maternel anormal, modélisé par l'induction d'une hypercholestérolémie, provoque le développement de plaques athéromateuses dans le système artériel foetal (Palinski et al., 2001). Chez l'humain, un métabolisme lipidique perturbé est retrouvé chez les femmes

obèses, diabétiques ou hypertensives. De plus, le développement de l'athérosclérose chez le fœtus est favorisé par une hypercholestérolémie maternelle (Napoli et al., 1997).

La problématique de mon projet est née d'un paradoxe connu et admis, mais dont les raisons d'existence demeurent encore incomprises. En effet, la grossesse entraîne des modifications métaboliques, notamment une augmentation du taux de lipides sanguins chez la mère, or, l'athérosclérose est liée à un excès d'afflux de cholestérol. Une question importante peut alors être soulevée : est-il possible que l'hypercholestérolémie durant la grossesse soit à la fois bénéfique et délétère pour le fœtus?

Les modifications métaboliques de la mère sont indispensables pour subvenir aux besoins énergétiques du fœtus : hormones, lipides, sucres, sels minéraux, oxygène. Ces changements se traduisent, entre autres, par une augmentation du taux de lipides sanguins chez la mère. Cet approvisionnement important en lipides est indispensable au fœtus puisque cet élément entre dans la composition des membranes cellulaires. De plus, le cholestérol est également l'élément précurseur d'un grand nombre d'hormones, en particulier les hormones stéroïdiennes. L'approvisionnement se fait intégralement par le placenta, véritable plateforme d'échanges entre la mère et le fœtus. Des troubles dans le transport lipidique peuvent générer des complications à court, moyen et long terme chez le fœtus (Farese and Herz, 1998). Ces troubles proviennent de la biosynthèse ou biodégradation du cholestérol du côté maternel, placentaire ou fœtal et font l'objet de recherches parallèles dans notre laboratoire. Seulement, les lipides ne sont pas solubles dans le sang, d'où la présence de protéines de transport : les apolipoprotéines ou apo(s). Ces dernières ont donc un rôle fondamental dans l'approvisionnement en lipides des tissus maternels, fœtaux et du placenta. Elles sont directement associées au développement de l'athérosclérose et de l'hypercholestérolémie chez les adultes (Belalcazar et al., 2003; Dhingra and Bansal, 2005; Magoori et al., 2003). Mais, la régulation de l'expression de ces apolipoprotéines au niveau placentaire est mal connue.

L'objectif de mon projet est d'étudier la régulation placentaire des apolipoprotéines dans la perspective de démontrer leur implication potentielle dans le développement de

l'athérosclérose au niveau fœtal. Ainsi, le cholestérol total sanguin maternel a été choisi comme variable puisque ce facteur est le plus représentatif du degré d'hypercholestérolémie. Plus spécifiquement, ce projet peut se définir alors par l'effet du cholestérol total maternel sur l'expression des apolipoprotéines du placenta chez l'humain.

Pour réaliser ce projet, à partir des placentas prélevés à l'hôpital lors de l'accouchement, trois apolipoprotéines majeures, l'apoA1, l'apoB et l'apoE ont été étudiées. Ces dernières ont fait l'objet d'une recherche à deux niveaux 1) au niveau de l'expression génétique, soit l'étude des variations de l'acide ribonucléique messager (ARNm), au moyen d'une technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel et 2) au niveau de la forme protéique responsable de l'effet biologique, par l'intermédiaire de trousse commerciales utilisant des dosages immuno-enzymatiques. Nos résultats montrent qu'une élévation du cholestérol maternel régule à la hausse l'expression de l'apoB, sans affecter l'apoA-1 ou l'apoE.

1. CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1. Le placenta

1.1.1. Formation du placenta

L'ovule est fécondé dans le tiers externe de la trompe de Fallope. Immédiatement, les divisions cellulaires se succèdent pour former un amas appelé la morula puis le blastocyte. Pendant cette période, l'œuf remonte jusqu'à la cavité utérine. Alors commence la différenciation cellulaire. Deux couches cellulaires se forment, la couche externe constituée de trophoblastes (ou cytotrophoblastes) et la couche interne nommée embryoblaste. Les cellules de la couche interne vont former l'embryon puis le fœtus. Les trophoblastes sont, eux, à l'origine du placenta. Ces cellules vont pénétrer dans l'épithélium de l'endomètre puis provoquer sa dégénérescence. La nidation s'effectue directement au niveau de la couche stromale de l'endomètre. La sécrétion de molécules d'adhérence par les trophoblastes facilite l'adhésion aux parois utérines. L'implantation se termine généralement au jour 10 ou 11 après l'ovulation. Le placenta en développement continue de détruire la paroi et émet des prolongements de plus en plus nombreux qui se ramifient à partir des premières ébauches villositaires formant de véritables bouquets de villosités choriales jusqu'au niveau des capillaires maternels. Suite au remodelage de la vascularisation dans l'endomètre par les cytotrophoblastes, une série d'espaces, appelés lacs sanguins, se créent. Ensuite, les cytotrophoblastes poursuivent leur multiplication et fusionnent en syncytiotrophoblaste. Ces cellules multinucléées représentent l'interface d'échanges entre la mère et le fœtus. Le syncytium forme une barrière continue face au sang maternel dans les villosités terminales.

Ainsi, il ne permet pas le mélange entre les deux circulations sanguines (maternelle et fœtale) (Fox et al., 1978).

1.1.2. Production hormonale placentaire

Le placenta produit, reçoit et transmet des signaux endocriniens entre la mère et le fœtus. Les hormones, comme l'hormone chorionique gonadotrope (hCG), la progestérone et l'estradiol régulent les flux nutritifs de la mère vers le fœtus (Gluckman and Pinal, 2002).

1.1.2.1. L'hormone chorionique gonadotrope

Durant les dix premières semaines, le placenta n'est pas capable de synthétiser la quantité nécessaire de progestérone pour maintenir la grossesse. L'hCG est une glycoprotéine synthétisée par les trophoblastes. Pour compenser le manque de progestérone, l'hCG assure une fonction d'hormone lutéinisante (LH) en plus de son rôle dans l'implantation et la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste (Shi et al., 1993; Srisuparp et al., 2001). La sécrétion de l'hCG varie au cours de la grossesse. Elle atteint un maximum à la fin du premier trimestre, puis diminue au fur et à mesure que le placenta produit la progestérone en quantité suffisante (Porter et al., 1982). La sécrétion d'hCG est régulée par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), les ligands du récepteur nucléaire X des rétinoïdes (RXR) et les récepteurs activant la prolifération des peroxyosomes (PPAR) (Guibourdenche et al., 1998; Keryer et al., 1998; Tarrade et al., 2001).

1.1.2.2. Les hormones stéroïdiennes

Une des particularités du placenta humain est son intense activité au niveau des hormones stéroïdes. En effet, la synthèse de progestérone est beaucoup plus importante chez l'humain que chez les autres mammifères. La présence de récepteurs à l'estradiol à la surface du placenta permet de favoriser la captation du cholestérol dans la circulation maternelle. Le

cholestérol, prélevé sous la forme de lipoprotéines, est l'élément précurseur de la progestérone placentaire (Albrecht and Pepe, 1990). Pour maintenir l'état de grossesse, la progestérone exerce une inhibition sur le système calcium-calmoduline. Ainsi, la progestérone régule l'activité des muscles lisses utérins. Cependant, la progestérone joue un autre rôle majeur lors de la grossesse. Cette hormone est impliquée dans la suppression de la prolifération et l'activation des lymphocytes maternels. Cette fonction immunosuppressive de la progestérone est indispensable pour prévenir le rejet du fœtus et du placenta par la mère (Pepe and Albrecht, 1995). Outre son rôle dans l'activation de la synthèse de progestérone, les estrogènes participent à la néo-vascularisation en augmentant le flux sanguin utéroplacentaire. Cette fonction confère aux estrogènes un contrôle positif sur les échanges gazeux et la disponibilité des nutriments pour le fœtus (Pepe and Albrecht, 1995).

1.1.2.3. L'insuline

L'insuline est une hormone régulant la disponibilité du glucose sanguin pour les cellules. Son rôle pendant la grossesse est crucial. En effet, des anomalies dans la régulation de l'insuline pendant la grossesse conduisent au développement du diabète gestationnel. Cette pathologie se manifeste après le premier tiers de la grossesse et augmente le risque de macrosomie fœtale (Chastang et al., 2003). Les origines du diabète gestationnel ne sont pas encore bien définies. Cependant, il semblerait que l'exacerbation de la production d'hormones, comme les estrogènes et la progestérone, soit liée au développement de cette pathologie. Ces hormones favorisent la production de l'insuline et accroissent sa sensibilité. Le placenta est capable de capter puis de dégrader l'insuline, réduisant ainsi la disponibilité du glucose (Steel et al., 1979). Les taux d'hormones sécrétées, notamment le taux d'hormone lactogène placentaire, augmentent avec la taille du placenta, ce qui génère une résistance à l'insuline à partir du deuxième tiers de la grossesse. La majorité des femmes sont capables de produire assez d'insuline pour compenser cette résistance. Les autres, qui représentent environ 7% des grossesses aux États-Unis, développent une hyperglycémie et un diabète gestationnel (Scollan-Koliopoulos et al., 2006).

1.1.3. Les échanges mère fœtus

En plus de son rôle dans le maintien de la grossesse, le placenta sert de centre d'échanges des nutriments entre la mère et le fœtus. Plus précisément, le sang maternel contient l'essentiel des nutriments nécessaires au développement fœtal (Battaglia and Meschia, 1988). Le placenta doit être capable de subvenir à tous les besoins du fœtus et de remplir les fonctions de tous les autres organes puisqu'il forme une barrière imperméable et sélective entre la circulation sanguine maternelle et fœtale (Hay, 1994). Les échanges se font par des mécanismes de transport utilisés dans d'autres organes comme le foie, les reins, les poumons, les intestins. Trois mécanismes ont été identifiés dans le placenta pour le transport des nutriments : la diffusion, le transport facilité ou actif et l'endocytose (Garnica and Chan, 1996). La sélectivité et l'efficacité de ces mécanismes doivent être adaptées à la nature et au volume des échanges, selon le régime alimentaire et la taille des espèces, ainsi qu'aux besoins spécifiques du fœtus et aux disponibilités maternelles, selon la période de gestation.

Ainsi, de nombreuses substances passent du sang maternel vers le sang fœtal et inversement. L'eau et certains électrolytes franchissent la barrière placentaire par osmose. Ce même procédé est utilisé pour l'épuration des déchets fœtaux comme l'urée, la créatinine et l'ammoniaque. Les gaz respiratoires subissent une simple diffusion : l'hémoglobine fœtale, responsable du transport de l'oxygène a une affinité plus élevée pour l'oxygène que l'hémoglobine maternelle. Les autres nutriments comme le calcium, les acides aminés le glucose et les lipides font appel à des mécanismes de transports plus ou moins sélectifs et actifs.

1.1.3.1. Transport du calcium

Le calcium est un élément vital pour le fœtus. Outre son importance dans la formation des os, le calcium est impliqué dans un grand nombre de processus biologiques comme la contraction musculaire, certaines réactions enzymatiques, la neurotransmission ou la signalisation cellulaire (Pitkin, 1983). Le transport placentaire du calcium est régi par un

processus de diffusion. En effet, un gradient de calcium se forme entre la circulation maternelle et le placenta. Cette homéostasie dépend et est régulée par un peptide apparenté à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) (Rodda et al., 1988). Mais, durant le dernier tiers de la grossesse, l'accroissement de la masse fœtale, notamment au niveau os, est très élevé. Le mécanisme de diffusion ne suffit plus à fournir la quantité de calcium nécessaire au développement. Le placenta compense la carence en calcium par un système de transport actif divisé en trois étapes. L'entrée du calcium à la surface apicale des trophoblastes semble impliquer deux canaux ioniques sélectifs nommés TRPV5 et TRPV6 (Moreau et al., 2002). Ensuite, des protéines cytosoliques du transport et/ou du stockage du calcium (CaBPs) acheminent le calcium du côté basal des cellules (Belkacemi et al., 2004). Enfin le calcium est sécrété dans la circulation fœtale par des pompes sodium/calcium ou via une ATPase localisée à la membrane plasmique (Lafond et al., 1991; Moreau et al., 2003).

1.1.3.2. Transport des acides aminés

Les acides aminés représentés dans le code génétique des mammifères sont au nombre de vingt. Tous sont requis pour une synthèse protéique optimale. Le transport des acides aminés par le placenta est important pour le développement fœtal. La concentration en acides aminés dans le placenta est plus forte que dans le sang maternel, le transport est donc dépendant d'énergie ou actif. Le passage des acides aminés dans le sang fœtal s'effectue selon un gradient de concentration, directement par diffusion ou par l'intermédiaire de transporteurs (Eaton and Yudilevich, 1981). La régulation du transport des acides aminés est complexe et dépend de plusieurs facteurs. Six mécanismes ont été identifiés pour permettre ce transport des acides aminés dans les cellules. Christensen et al. (Christensen, 1984; Christensen and Handlogten, 1979; Christensen and Liang, 1966) ont défini la nomenclature des transporteurs impliqués. En ce qui concerne le placenta, seulement trois de ces mécanismes ont été retrouvés (Enders et al., 1976). La spécificité des mécanismes tient compte des propriétés ioniques des acides aminés (forme anion, cation ou zwitterion) et du type de transporteur, qui peut être soit sodium dépendant soit sodium indépendant (Regnault et al., 2002).

1.1.3.3. Transport du glucose

Le glucose est une source primaire d'énergie puisque la néoglucogenèse fœtale étant de faible intensité, l'essentiel du glucose est apporté par la mère. Comme le calcium, les besoins en glucose sont très importants dans le dernier tiers de la grossesse, c'est-à-dire lorsque la croissance du fœtus est maximale. Plusieurs facteurs régulent le transfert materno-fœtal du glucose comme l'apport maternel de glucose, le métabolisme du glucose dans le placenta et la densité des transporteurs. Un transport passif existe entre la mère et le fœtus, mais il ne peut à lui seul subvenir aux besoins fœtaux (Illsley et al., 1985; Jansson et al., 1993). La présence de transporteurs de glucose (GLUT) est donc nécessaire pour pallier ce manque. Ces récepteurs placentaires fonctionnent selon le système de diffusion facilitée et sont sodium indépendant. Chez l'humain, douze isoformes ont été identifiées jusqu'à présent (Joost and Thorens, 2001). Ces transporteurs semblent soumis à une régulation par le glucose extracellulaire, l'insuline, le facteur de croissance semblable à l'insuline de type 1 (IGF), l'hormone de croissance placentaire (PGH) et l'hypoxie (Baumann et al., 2002).

1.1.3.4. Transport des lipides

De manière quantitative, le glucose et les acides aminés sont les deux principaux nutriments transférés dans la circulation fœtale (Hay, 1994; Knipp et al., 1999). Le développement fœtal dépend directement de leur disponibilité. Cependant, même si les quantités de lipides transférés sont moins importantes, leur rôle dans le développement du fœtus est vital. En effet, l'apport anormal en lipides au cours de la grossesse peut altérer le développement du fœtus et du nouveau-né (Herrera, 2002). Les lipides sont composés de quatre classes de molécules : les acides gras, les triglycérides, les phospholipides et les stéroïdes. Cette dernière catégorie comporte entre autres le cholestérol. Le métabolisme des acides gras pendant la grossesse est perturbé et comporte deux phases importantes. En effet, la première moitié de la grossesse est caractérisée par une activité lipogénique importante suivie dans la seconde moitié par une activité lipolytique.

Chez la mère, une augmentation du dépôt lipidique, et donc de l'indice de masse corporelle (BMI), est observée dans les adipocytes en début de grossesse (Villar et al., 1992). Ce dépôt d'acides gras est favorisé par une augmentation de la lipogenèse, une hyperphagie et possiblement une activité intense de la lipoprotéine lipase (LPL) (King et al., 1994; Knopp et al., 1975; Palacin et al., 1991). Cette dernière est responsable de l'hydrolyse des triglycérides (TG) contenus dans les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), en acides gras et en glycérol. L'accumulation de dépôts lipidiques lors de la grossesse se traduit par une prise de poids de la mère. Un gain de poids excessif durant la grossesse a été corrélé à certaines pathologies comme la macrosomie fœtale et l'obésité infantile (Johnson et al., 1992; Zhou and Olsen, 1997). Pendant la phase maximale de croissance du fœtus, le stockage des lipides dans le tissu adipeux s'arrête au profit d'une importante lipolyse et donc d'une hypertriglycémie (Herrera et al., 1988). Au cours de la grossesse, l'augmentation de la résistance à l'insuline et de la concentration en estrogènes est responsable de cette hypertriglycémie. En effet, ces deux variations permettent l'accroissement de la sécrétion des VLDL et des acides gras libres dans le sang maternel tout en réprimant l'activité de la LPL (Ramos and Herrera, 1995).

Les acides gras sont véhiculés dans le sang par différents transporteurs. Parmi ceux-ci, on retrouve l'albumine et l'alpha-fétoprotéine, la dernière étant prédominante dans la circulation fœtale (Courtois et al., 1992; Rose et al., 1990). Ces deux protéines transportent principalement un type de lipides, les acides gras libres. Les lipoprotéines participent également au transport d'une partie des acides gras : les acides gras poly-insaturés. Ces derniers sont transportés sous la forme de TG, de phospholipides ou d'esters de cholestérol, ces trois composés étant les éléments constitutifs principaux des lipoprotéines (Herrera, 2002).

À la surface placentaire, le transfert des acides gras peut s'effectuer par diffusion, transcytose ou endocytose via une liaison spécifique à un récepteur (Broring et al., 1989; Wyne and Woollett, 1998). La présence de protéines de transport des acides gras (FABP) a été démontrée au niveau de la membrane des cellules placentaires. Ces protéines prélèvent

préférentiellement les acides gras poly-insaturés à longue chaîne. Par la suite, les acides gras sont transportés à travers la cellule par des FABP cytosoliques puis sécrétés dans la circulation fœtale (Veerkamp et al., 1991). Les acides gras, les phospholipides, les triglycérides, ainsi que leurs métabolites ont pour fonction de fournir de l'énergie aux cellules. Contrairement aux autres lipides, le cholestérol n'a pas ce rôle d'énergie.

1.2. Le métabolisme du cholestérol

1.2.1. Le cholestérol

Le cholestérol est la combinaison d'un stéroïde et d'un alcool. Cet élément a de multiples fonctions dans la plupart des processus biologiques vitaux pour la cellule. De ce fait, une perturbation du métabolisme du cholestérol engendre des effets néfastes pour la cellule. L'hypercholestérolémie est caractérisée par un taux élevé de cholestérol dans la circulation. Les populations des pays développés sont fréquemment affectées par ce problème. De cet état physiologique naît l'athérosclérose, pathologie souvent liée aux accidents cardiovasculaires (Braunwald, 1997). Le cholestérol est un composant essentiel des membranes cellulaires, son rôle est de réguler la fluidité (rigidité) de ces membranes (Carmena et al., 1991). Sa présence au niveau membranaire est aussi requise pour la formation des cavéoles et des puits recouverts de clathrine (structures permettant l'endocytose). Ainsi, le cholestérol participe aux échanges cellulaires (Carozzi et al., 2000; Schlegel and Lisanti, 2001). Cette molécule a une fonction fondamentale dans la synthèse hormonale. En effet, le cholestérol représente le précurseur des hormones stéroïdiennes comme la progestérone, la testostérone, le cortisol, l'aldostérone et l'estradiol (Ryan and Smith, 1961; Smith and Ryan, 1961). Les hormones stéroïdiennes sont synthétisées en grande quantité dans le placenta, leurs rôles principaux sont le maintien de la grossesse et la régulation des flux de nutriments dans le système materno-fœtal (Jaffe and Peterson, 1966). L'étude du métabolisme du cholestérol et de son transfert au fœtus par le placenta est donc nécessaire pour comprendre le développement fœtal.

1.2.2. Le cholestérol endogène

L'apport de cholestérol à la cellule peut se faire de deux façons, soit par la synthèse de cholestérol par la cellule elle-même (source endogène), soit par le sang (source exogène). Dans le premier cas, la biosynthèse de cholestérol s'effectue à partir de l'acétylcoenzyme A provenant des peroxyosomes ou des mitochondries du cytoplasme. La synthèse du cholestérol se fait principalement par les cellules hépatiques et l'intestin, mais toute cellule en est capable (Herrera, 2002). Le cholestérol exogène provient des lipoprotéines sanguines. Quatre catégories de lipoprotéines existent, leur classification dépend de la densité de ces macromolécules. On retrouve donc, les lipoprotéines de haute densité (HDL), de densité intermédiaire (IDL), de faible densité (LDL) et de très faible densité (VLDL).

L'essentiel des connaissances au sujet du métabolisme hépatique du cholestérol a été apporté par les Dr J. Goldstein et Dr. M. Brown (Anderson, 2003). Le métabolisme du cholestérol est une cascade de réactions faisant appel à plusieurs enzymes. La 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-Coenzyme A réductase (HMG-CoA-réductase), la cholestérol 7- α -hydroxylase (7-OHChol) et l'acétylcoenzyme A cholestérol acétyltransférase (ACAT) sont les trois enzymes clés du métabolisme du cholestérol (Smith et al., 1998).

La HMG-CoA-réductase est l'enzyme qui initie la synthèse de cholestérol. Dans la cellule, elle se situe au niveau du réticulum endoplasmique. Elle catalyse la transformation de β -hydroxy- β -méthyl-glutaryl-Coenzyme A en mévalonate. La régulation de l'HMG-CoA-réductase est complexe, d'autant plus que sa concentration dans la cellule est très variable. Les oxystérols et le cholestérol modulent l'activité en tant qu'inhibiteurs (rétrocontrôle négatif des produits de synthèse). Cette inhibition est forte mais pas totale, une activité résiduelle d'environ 10% est nécessaire pour la synthèse de molécules indispensables au cycle cellulaire (Goldstein and Brown, 1990; Hampton et al., 1996). Ensuite, une autre étude (Yokoyama et al., 1993) a démontré l'existence d'un facteur de transcription, localisé dans le réticulum endoplasmique, qui régule l'expression de protéines possédant des éléments de

réponse aux stérols (SRE). La HMG-CoA-réductase contient une séquence SRE. Lorsque la concentration intracellulaire en cholestérol est faible, ce facteur de transcription, nommé protéine de liaison au SRE (SREBP), est clivé. La forme SREBP clivée est active, elle traverse la membrane nucléaire pour induire la transcription de gènes comme la HMG-CoA-réductase (Brown and Goldstein, 1999).

La 7-OHChol est également indispensable au métabolisme du cholestérol, car c'est l'enzyme catalysant la dégradation du cholestérol dans la cellule. Une des manières de cataboliser le cholestérol est la formation d'acides biliaires (acide cholique et acide chénodésoxycholique). La 7-OHChol permet l'entrée dans cette voie de dégradation en transformant le cholestérol en 7 α -hydroxycholestérol. Comme pour la HMG-CoA-réductase, un système de rétro inhibition par les produits de cette voie existe. Le cholestérol et les oxystérols ont la capacité d'influencer l'expression de la 7-OHChol (Doerner et al., 1995; van Cantfort, 1972). Le facteur de transcription SREBP pourrait être impliqué dans ce mécanisme (Li et al., 2006).

L'ACAT a un rôle déterminant, non pas dans la synthèse ni la dégradation du cholestérol, mais dans la transformation du cholestérol. Toutes les cellules, en particulier les cellules hépatiques, sont capables de stocker le cholestérol. Mais, le cholestérol doit subir une estérification pour être accumulé. L'ACAT catalyse cette réaction à partir de l'oléylcoenzyme A et du cholestérol membranaire des organites localisés au niveau du réticulum endoplasmique. L'ACAT est sensible au taux de cholestérol intracellulaire (endogène et exogène) et va déterminer la quantité de cholestérol assemblé sur les lipoprotéines (Liu et al., 2005; Suckling and Stange, 1985). L'estérification du cholestérol peut être réalisée aussi dans le sang par une enzyme plasmatique, une Lécithine Cholestérol Acyl Transférase (LCAT). La différence est que le substrat est une lécithine et non l'oléylcoenzyme A. Cette estérification est nécessaire pour faciliter le transport du cholestérol par les HDL. Ainsi, la LCAT joue un rôle dans l'efflux de cholestérol de la périphérie vers le foie (Rose and Juliano, 1977; Warden et al., 1989).

Des dysfonctionnements dans la régulation de ces enzymes pendant la grossesse peuvent conduire au développement de malformations (Farese and Herz, 1998). Les enzymes clés ont

des activités variables lors de la grossesse. Ces différences s'observent suite à une variation de la disponibilité du cholestérol pour les cellules et selon que l'on parle d'activité enzymatique dans le foie maternel, dans le placenta ou dans le foie fœtal (Montoudis et al., 2003; Smith et al., 1998). Le métabolisme du cholestérol dans le placenta est actif. Cependant, les lipoprotéines de la circulation maternelle peuvent fournir une source de cholestérol supplémentaire au placenta. Cet apport est soit utilisé par le placenta, soit transféré au fœtus (Woollett, 1996).

1.2.3. Le transport du cholestérol par le placenta

Woollett et al. (Woollett, 1996) ont démontré que le cholestérol fœtal pouvait provenir de deux sources. Cette étude, réalisée chez le hamster, a mis en évidence que la totalité du cholestérol accumulé par le fœtus au cours de la gestation n'était pas exclusivement issue de la biosynthèse du cholestérol par le foie fœtal. Le sac vitellin et le placenta semblent prélever les lipoprotéines maternelles. Le cholestérol transporté par les lipoprotéines maternelles apparaît donc comme une source exogène possible pour approvisionner le fœtus. Une meilleure compréhension de ce processus est nécessaire pour élucider les mécanismes du développement fœtal. Puis, Wyne et al. (Wyne and Woollett, 1998) ont mis en évidence, toujours chez le hamster, le rôle de plusieurs récepteurs aux lipoprotéines maternelles dans la clearance de ces macromolécules au niveau de la surface placentaire. En effet, le récepteur aux LDL (LDLR) est exprimé au niveau des membranes placentaires, confirmant ainsi l'entrée des LDL dans le placenta et donc un apport maternel possible de cholestérol. De plus, le récepteur éboueur de classe B type 1 (SR-B1) et la glycoprotéine 330 (gp 330), qui sont impliqués dans l'efflux de cholestérol, sont aussi exprimés par le placenta. Ces résultats appuient l'hypothèse d'une sécrétion de cholestérol maternel dans la circulation fœtale. D'autres études viennent confirmer la contribution de l'apport maternel du cholestérol au fœtus (Furuhashi et al., 1989; Lee et al., 2005; Overbergh et al., 1995; Wittmaack et al., 1995). Ces études démontrent la capacité du placenta à prélever les lipoprotéines, celle-ci étant associée à une augmentation du cholestérol chez le fœtus. Cependant, une étude, menée par Schmid et al. (Schmid et al., 2003) valide ce principe. En effet, cette dernière, réalisée *in*

vitro avec la lignée de cellules trophoblastiques BeWo, montre que le cholestérol extracellulaire est prélevé à la surface apicale de la cellule, ensuite, il est transporté jusqu'à la membrane basale pour être excrété.

1.3. Les apolipoprotéines

Tous les aspects du transport du cholestérol maternel jusqu'au fœtus n'ont pas encore été étudiés. Parmi ceux-ci, on retrouve les protéines responsables du transport des lipides dans le sang, les apolipoprotéines. En effet, les lipides sont des molécules insolubles dans le sang, par conséquent ils sont véhiculés par des protéines, les apolipoprotéines. Le complexe formé est alors nommé lipoprotéine. Différentes combinaisons de lipides et de protéines produisent des lipoprotéines de densité différente (VLDL, LDL, IDL, HDL). Sous cette forme, les lipides sont solubles dans le sang et peuvent être acheminés dans toutes les cellules de l'organisme. Les apolipoprotéines sont donc au centre du transport lipidique. Ce sont des glycoprotéines dont la masse moléculaire est très variable (de 6500 à 550000 Da). On en retrouve plusieurs types, chacun pouvant avoir plusieurs isoformes. Les plus importants sont les apolipoprotéines de type A (apoA), B (apoB), C (apoC), D (apoD) et E (apoE). Elles sont retrouvées chez l'humain ainsi que tous les mammifères. Leur synthèse se fait principalement au niveau du foie et de l'intestin, mais d'autres organes sont capables de les produire comme le cerveau, les reins, le cœur et le placenta. Étant les transporteurs du cholestérol dans le sang, les apolipoprotéines sont également associées à l'hypercholestérolémie et à l'athérosclérose.

1.3.1. L'apolipoprotéine A-I

L'apoA-I est une des premières apolipoprotéines à avoir été identifiée et caractérisée. C'est un polypeptide de 28000 Da, composé de 243 acides aminés. Sa séquence fut décrite par Brewer et al. (Brewer et al, 1978). Le gène de l'apoA-I est localisé sur le chromosome 11. Il appartient à une superfamille de gènes regroupant les gènes codant pour des apolipoprotéines interchangeables au sein des lipoprotéines : l'apoA-I, l'apoA-II, les apoCs,

l'apoE (Li et al., 1988). Cette propriété est issue de l'évolution (duplications, mutations) d'un même gène ancestral. Le locus du gène de l'apoA-I est à proximité du gène de l'apoC-III et de l'apoA-IV (Bruns et al., 1984; Karathanasis, 1985). Ce complexe multigénique est soumis à un polymorphisme qui a été associé à des altérations du métabolisme lipidique (Ordovas et al., 1989; Tybjaerg-Hansen et al., 1993). Le foie et l'intestin sont les organes qui produisent le plus d'apoA-I (Wu and Windmueller, 1979). (Zannis et al., 1985).

1.3.1.1. Régulation de l'apolipoprotéine A-I

Le promoteur du gène de l'apoA-I possède quatre domaines nommés A, B, C et D. Les séquences B, C et D sont responsables de la transcription du gène dans les cellules de la lignée HepG2 (Papazafiri et al., 1991). Ces séquences lient un facteur de transcription hépatique nucléaire (HNF-4) et la protéine activatrice de la séquence CCAAT (C/EBP). L'expression de l'apoA-I dans la lignée Caco-2 nécessite l'activation d'une séquence du promoteur de l'apoCIII et la présence de HNF-4 (Kardassis et al., 1997). HNF-1, HNF-3, HNF-4 et C/EBP sont quatre facteurs de transcription majeurs présents dans le foie (Pontoglio, 2000; Schrem et al., 2002; Sladek, 1994). Les éléments B et D contiennent des séquences de réponse aux hormones (Papazafiri et al., 1991; Tzameli and Zannis, 1996). En effet, une multitude d'hormones régulent l'expression de l'apoA-I à plusieurs niveaux, transcription et post-transcription. Ainsi, les hormones thyroïdiennes (Apostolopoulos et al., 1987; Strobl et al., 1990; Taylor et al., 1996; Vandenbrouck et al., 1995), les hormones stéroïdiennes (Kalin and Zumoff, 1990), les glucocorticoïdes (Elshourbagy et al., 1985a), les rétinoïdes (Zech et al., 1983) et l'insuline (Lin, 1988; Murao et al., 1998) affectent ce processus. Le cholestérol étant le précurseur des hormones stéroïdiennes et considérant le rôle crucial de celles-ci lors de la grossesse, l'expression de l'apoA-I dans le placenta est nécessaire à la compréhension de la physiologie placentaire.

1.3.1.2. Fonctions de l'apolipoprotéine A-1

L'apoA-I est un composant essentiel des HDL. Elle est importante non seulement pour le transport, mais également pour la structure de la lipoprotéine. En effet, chaque HDL contient au minimum une copie de l'apoA-I. Les HDL sont impliquées dans le mécanisme de transport inverse du cholestérol. Ce procédé consiste à capter le cholestérol des cellules en périphérie pour le transporter jusqu'au foie où il sera dégradé par la voie de synthèse de la bile (Fielding and Fielding, 1995; Yokoyama, 2000). Trois mécanismes permettent le transport inverse du cholestérol : la diffusion aqueuse (Johnson et al., 1991), le procédé faisant intervenir un transporteur avec domaine liant l'ATP de type A1 (ABCA1) (Lawn et al., 1999) et le flux de cholestérol induit par SR-B1 (de la Llera-Moya et al., 1999).

L'apoA-I a un rôle important dans ces trois systèmes. Le processus de diffusion est régulé par un gradient de cholestérol entre le donneur (la cellule) et l'accepteur (une molécule de HDL) (Phillips et al., 1987). L'apoA-I semble impliquée dans le transport intracellulaire du cholestérol vers la membrane, au niveau des cavéoles. L'apoA-I participe à l'enrichissement de la membrane en cholestérol, favorisant ainsi le gradient et donc la diffusion (Sviridov et al., 2001). Conjointement, l'apoA-I et ABCA1 participent à la formation des HDL et à l'efflux de cholestérol (Panagotopoulos et al., 2002). L'apoA-I régule ABCA1 au niveau post-transcriptionnel. En effet, la stabilité d'ABCA1 dans le cytoplasme nécessite la formation d'un complexe avec l'apoA-I qui empêche la dégradation (Arakawa and Yokoyama, 2002). SR-B1 est un récepteur multi ligands (HDL, LDL, LDL oxydées) (Rigotti et al., 1995). Le cholestérol est acheminé jusqu'au foie où il est capté par SR-B1 qui reconnaît l'apoA-I (Thuahnai et al., 2003).

L'apoA-I est également impliquée dans un autre processus facilitant le transport inverse du cholestérol en tant que cofacteur de l'acyltransférase de cholestérol par la lécithine (LCAT). L'activation de la LCAT par l'apoA-I permet l'estérification du cholestérol sanguin sur les HDL (Jonas, 2000). Cette modification est essentielle pour la maturation de ces lipoprotéines (McManus et al., 2000).

Le transport inverse du cholestérol est indispensable puisque la majorité des cellules somatiques ne sont pas capables de dégrader le cholestérol (Fielding and Fielding, 1995). Ce processus permet donc de diminuer la concentration de cholestérol dans les organes périphériques ainsi que dans la circulation. Une altération de ces mécanismes entraîne donc une accumulation de cholestérol dans la cellule et dans la circulation. Cette perturbation engendre une hypercholestérolémie et favorise le développement de l'athérosclérose. La place de l'apoA-I au sein du système de transport du cholestérol permet d'envisager un rôle important de cette protéine dans l'étiologie de l'athérosclérose. En effet, l'apoA-I est souvent caractérisée de facteur antiathérogénique. Ordovas et al. (Ordovas et al., 1989) ont montré qu'une mutation au niveau du complexe multigénique comprenant l'apoA-I accélère le développement de l'athérosclérose. Une autre étude a caractérisé ce rôle protecteur de l'apoA-I par une surexpression du gène dans un modèle d'hypercholestérolémie chez la souris (Belalcazar et al., 2003). De plus, Ou et al. (Ou et al., 2003) ont observé une restauration de la fonction vasculaire de l'épithélium de souris hypercholestérolémique par un mimétique de l'apoA-I. Cette protéine apparaît donc comme une composante clé dans le transport du cholestérol. Bien que le placenta soit capable de synthétiser l'apoA-I (Richardson et al., 1996), l'expression de cette protéine dans cet organe n'a pas encore été déterminée dans le cadre du transport du cholestérol entre la mère et le fœtus.

1.3.2. L'apolipoprotéine B

L'apoB est l'apolipoprotéine la plus étudiée à ce jour. Deux formes sont retrouvées chez l'humain, l'apoB100 et l'apoB48. L'apoB100 a une masse de 550000 Da. La deuxième forme est une protéine tronquée et dont la masse équivaut à 48% de celle de l'apoB100 (Kane et al., 1980). Contrairement aux autres apolipoprotéines, elle n'est pas interchangeable. L'apoB100 est principalement synthétisée par les hépatocytes et les entérocytes alors que l'apoB48 est issue exclusivement des entérocytes (Cladaras et al., 1986; Kane, 1983). C'est un élément fondamental du transport des lipoprotéines comme les LDL, les IDL et leurs précurseurs les VLDL (Jackson et al., 1976). L'apoB est responsable du transport des lipides des intestins au foie puis du foie à toutes les cellules du corps. Elle est donc au centre du

transport du cholestérol destiné à l'approvisionnement des cellules des organes périphériques. La régulation de l'apoB est complexe et intervient principalement au niveau de la post-transcription.

1.3.2.1. Régulation de l'apolipoprotéine B

Le gène de l'apoB est localisé sur le chromosome 2 chez l'humain (Law et al., 1985). Plusieurs facteurs sont capables de réguler la transcription du gène. Ce dernier comporte plusieurs séquences capables de lier les principaux facteurs de transcription hépatiques. Ainsi, HNF-3 (Paulweber et al., 1993), HNF4 (Ladas et al., 1992) et C/EBP (Zannis et al., 1991) peuvent lier certaines séquences du promoteur pour en réguler la transcription. En effet, des mutations au niveau des sites de liaison de ces facteurs de transcription entraînent une diminution drastique (plus de 90%) de l'activité du promoteur. La transcription du gène produit un seul acide ribonucléique messager (ARNm). L'apoB100 et l'apoB48 sont issues de ce même ARNm. La ségrégation naît de la substitution d'une base cystéine par un uracile en position 6666 du gène. En conséquence, la glutamine au codon 2153 est remplacée par un codon stop, terminant prématurément la traduction pour former l'apoB48 (Powell et al., 1987). Ce mécanisme est appelé édition de l'ARNm de l'apoB.

La régulation de l'expression de l'apoB est également dépendante de l'activité endocrine de l'organisme. Plusieurs études réalisées sur la lignée HepG2 et le foie de rongeurs ont montré une influence des hormones thyroïdiennes sur la transcription du gène (Theriault et al., 1992). De plus, elles régulent le processus d'édition de l'ARNm (Davidson et al., 1990; Davidson et al., 1988) (Mukhopadhyay et al., 2003). D'autres hormones comme l'hormone de croissance, les glucocorticoïdes et l'insuline modulent également ce mécanisme (Linden et al., 2000; Lorentz et al., 1996). Aussi, la concentration de l'apoB dans le sang semble être associée aux estrogènes et à la testostérone (Kutteh et al., 1994). Du fait de l'exacerbation du système endocrinien pendant la grossesse, l'étude de l'expression de l'apoB placentaire pourrait être utile à la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement fœtal.

1.3.2.2. Fonctions de l'apolipoprotéine B

Le rôle principal de l'apoB est d'approvisionner en cholestérol les organes périphériques par l'intermédiaire des LDL. L'apoB est l'élément central de la structure des VLDL et LDL. En effet, les personnes souffrant d'abetalipoprotéinémie n'ont pas d'apoB incorporée dans les LDL. Ces personnes ont de graves carences en cholestérol et autres lipides, suggérant un rôle crucial de l'apoB dans l'assemblage des VLDL et LDL (Kayden, 1972).

L'initiation de la synthèse des lipoprotéines et de l'apoB s'effectue dans le réticulum endoplasmique (Claude, 1970; Olofsson et al., 1987). De plus, il semble que l'assemblage des VLDL se termine avec l'entrée dans l'appareil de Golgi (Glaumann et al., 1975). Dans le réticulum endoplasmique, l'apoB synthétisée subit une régulation post-transcriptionnelle complexe par un système de translocation partielle (Sakata et al., 2001). Cette translocation permet un transport rétrograde dans le cytosol et l'entrée de l'apoB dans une voie de dégradation pré-sécrétoire par le système ubiquitine-protéasome (Fisher et al., 1997; Yao et al., 1997; Zhou et al., 1998a). Le processus de translocation est régulé par plusieurs facteurs, dont la 7-OHChol et les oxystérols suggérant un rôle du cholestérol cellulaire dans l'expression de l'apoB (Du et al., 1999). De plus, plusieurs protéines chaperonnes sont requises pour l'entrée de l'apoB dans la voie de dégradation.

La protéine microsomale de transfert de triglycérides (MTP) est nécessaire pour initier l'assemblage des VLDL à partir de l'apoB (Davidson and Shelness, 2000). La MTP permet la translocation des lipides du cytoplasme sur l'apoB localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique (Wetterau and Zilversmit, 1986). Elle permet la lipidation de l'apoB, dépendamment de la disponibilité des lipides dans la cellule (Wetterau et al., 1992). Une lipidation incomplète de l'apoB par la MTP active le mécanisme de dégradation de l'apoB (Benoist and Grand-Perret, 1997). Ainsi, l'activité de la MTP régule la quantité d'apoB excrétée (Raabe et al., 1998).

Les VLDL sécrétés dans la circulation évoluent en IDL puis en LDL grâce à l'intervention de deux lipases : la lipase hépatique (HL) et la LPL. À la périphérie, notamment dans le placenta, des récepteurs membranaires spécifiques aux LDL (LDLR) reconnaissent l'apoB

(Wyne and Woollett, 1998). La lipoprotéine est ensuite internalisée et l'apoB est totalement catabolisée en acides aminés. Les LDL sont la source exogène principale de lipides et de cholestérol pour l'organisme (Brown and Goldstein, 1976).

Les niveaux de sécrétion de l'apoB sont impliqués dans plusieurs pathologies. La littérature actuelle admet que l'augmentation du cholestérol sanguin, ou hypercholestérolémie, est toujours associée à une concentration élevée de LDL et d'apoB. L'accumulation des LDL dans les artères favorise leur oxydation par des radicaux libres (Witztum, 1993). Les LDL oxydées sont très athérogéniques (Olofsson and Boren, 2005). En effet, elles sont prélevées dans la circulation par les récepteurs aux LDL oxydées de type I (LOX-1) et les SR-B1 qui sont fortement exprimés par les monocytes et macrophages présents au niveau de l'épithélium vasculaire (Takahashi et al., 1992). Les LDL oxydées et LOX-1 contribuent ainsi à la formation de l'athérome dans les artères (Tsimikas, 2006). De plus, ces lipoprotéines semblent avoir des propriétés chémoattractives vis à vis des monocytes circulants (Berliner et al., 1990). L'apoB apparaît donc comme un marqueur du développement de l'athérosclérose (Mehta et al., 2006).

La synthèse de l'apoB a été démontrée dans le placenta (Madsen et al., 2004). Cependant, aucune information sur l'expression de l'apoB placentaire en fonction du cholestérol maternel n'est disponible. Pourtant, son étude est nécessaire puisqu'une probable origine fœtale de l'athérosclérose a été avancée dans la littérature (Palinski and Napoli, 2002; Radunovic et al., 2000).

1.3.3. L'apolipoprotéine E

L'apoE est une protéine de 39000 Da dont le gène est localisé sur le chromosome 19. Le gène appartient à un complexe multigénique comprenant également l'apoC-1, l'apoC-IV et l'apoC-II. Un polymorphisme de l'apoE existe chez l'humain (Utermann et al., 1980). Trois isoformes différentes peuvent être produites l'apoE2, l'apoE3 et l'apoE4 provenant de trois allèles distincts. Ainsi, six génotypes possibles ont été identifiés chez l'humain,

dépendamment de la combinaison d'allèle. Les différences entre ces protéines sont minimes (une différence de deux acides aminés) mais importantes puisqu'elles modifient la capacité de l'apoE à lier les lipides (Salah et al., 1997) ou affectent l'affinité de la liaison apoE-récepteur (Rall et al., 1982). Plusieurs études montrent une influence du polymorphisme sur le métabolisme du transport du cholestérol (Lehtimäki et al., 2002; Tsuda et al., 2001). L'apoE est donc un élément central du transport du cholestérol. Ce polymorphisme est aussi retrouvé lors de la grossesse et influence le métabolisme des lipoprotéines (McGladdery and Frohlich, 2001). L'apoE entre dans la composition des lipoprotéines de type VLDL, IDL, LDL et HDL. Sa fonction principale est donc de permettre la solubilisation des lipides pour que leur transport dans la circulation puisse s'effectuer. Contrairement aux autres apolipoprotéines, l'apoE est synthétisée dans le foie, le cerveau et la majorité des tissus périphériques (Zannis et al., 1985), y compris le placenta (Rindler et al., 1991). L'apoE pourrait jouer un rôle important dans le transport du cholestérol de la mère au fœtus.

1.3.3.1. Régulation de l'apolipoprotéine E

Smith et al. (Smith et al., 1988) ont montré que le promoteur de l'apoE possède six éléments régulateurs proximaux (nommé de I à VI). À l'intérieur du promoteur, deux autres régions, DI et DII, ont été identifiées. Les éléments I, III et IV sont reconnus par le facteur de transcription Sp1. Les autres éléments proximaux lient des protéines qui ne sont pas encore identifiées. Cependant, DI et DII sont essentiels dans la transcription du gène au niveau hépatique. L'activation ou non de ces éléments régulateurs va déterminer l'expression de l'apoE dans les différents organes. De plus, deux autres régions localisées de part et d'autre du pseudogène de l'apoC-1, sont également nécessaires pour la transcription hépatique de l'apoE (Simonet et al., 1991). Ces séquences sont sensibles aux facteurs de transcription hépatiques comme HNF-3, HNF-4 et C/EBP (Dang and Taylor, 1996; Dang et al., 1995). Tout comme l'apoA-I et l'apoB, l'apoE est sensible aux hormones, notamment les hormones thyroïdiennes (Benavenga et al., 1993), l'hormone de croissance (Oscarsson et al., 1991) et l'estradiol (Struble et al., 2006). L'insuline a un effet sur l'apoE seulement en co-traitement avec des glucocorticoïdes de synthèse (Lin, 1988).

1.3.3.2. Fonctions de l'apolipoprotéine E

Plusieurs fonctions sont attribuées à l'apoE (Mahley, 1988). Elle semble en effet avoir des propriétés antioxydantes (Miyata and Smith, 1996), antiprolifératives (Ishigami et al., 1998) et immunorégulatrices (Zhou et al., 1998b). L'expression de l'apoE dans le cerveau laisse penser que cette protéine a une fonction particulière dans le système neuronal (Elshourbagy et al., 1985b). En effet, l'isoforme apoE4 est associée au développement de la maladie d'Alzheimer (Strittmatter et al., 1993). Depuis cette découverte, plusieurs études viennent appuyer cette hypothèse. Ces études ont montré une expression spécifique de l'apoE par les cellules gliales du cortex frontal et de l'hippocampe, structure impliquées dans la mémoire (Harris et al., 2004; Xu et al., 1999). Dans cette pathologie, l'apoE aurait pour fonction de réguler l'homéostasie du cholestérol dans les neurones (Herz and Bock, 2002; Poirier, 2005). Dans le cerveau, l'apoE semble être le transporteur principal des lipoprotéines. Elle régulerait le transport du cholestérol dans tout le système nerveux central. De plus, chez le fœtus, elle participe au développement du système nerveux (Witsch-Baumgartner et al., 2004). L'estradiol et les oxystérols pourraient influencer l'homéostasie du cholestérol en modulant l'expression de l'apoE au niveau du cerveau (Abildayeva et al., 2006; Struble et al., 2006).

Cependant, la régulation de l'homéostasie du cholestérol par l'apoE n'est pas restreinte aux neurones, elle est présente dans tout l'organisme. En effet, bien que l'apoE soit associée aux VLDL, IDL et aux LDL, elle est considérée comme un élément important du transport inverse du cholestérol. L'apoE participe à ce mécanisme de manière très active. L'apoE est un ligand de la majorité des récepteurs aux lipoprotéines. Elle est reconnue notamment par SR-B1 (Thuahnai et al., 2001), le récepteur aux VLDL, le LDLR (Weisgraber, 1994) et le récepteur apparenté au LDLR (LRP) (Beisiegel et al., 1989; Fisher et al., 2000; Herz and Bock, 2002; Zhu and Hui, 2003). De plus, il semblerait que l'apoE puisse lier le LDLR avec une haute affinité comparé à l'apoB. Cette polyvalence de l'apoE pour les récepteurs aux lipoprotéines permet d'accélérer le prélèvement du cholestérol par les cellules. Cependant, un autre rôle dans le transport inverse du cholestérol peut lui être attribué. L'apoE est, comme l'apoA-I, un cofacteur de la LCAT (Zhao et al., 2005). Son rôle dans l'athérosclérose est

admis dans la littérature et est très utilisé dans la recherche. En effet, un des modèles animaux d'athérosclérose le plus courant est un rongeur mutant pour le gène de l'apoE (Magoori et al., 2003; Rosenblat et al., 2006; Yu et al., 2006). Ce modèle développe toutes les caractéristiques de l'athérosclérose : l'hypercholestérolémie, le développement des plaques athéromateuses et l'effervescence du système immunitaire. L'apoE diminue la concentration de cholestérol dans le sang, suggérant un effet antiathérogénique. Néanmoins, l'apoE peut influencer le développement de l'athérosclérose par un autre mécanisme non identifié (Tsukamoto et al., 2000).

Il semblerait que le transport du cholestérol par cette apolipoprotéine soit régulé par le cholestérol lui-même. En effet, l'ajout de cholestérol influencerait l'expression de l'apoE dans une lignée cellulaire dérivée des adipocytes (Mazzone et al., 1989; Zechner et al., 1991). Cette hypothèse fut confirmée par la suite en utilisant des LDL (Mazzone and Basheeruddin, 1991). Cette régulation pourrait dépendre du récepteur X du foie LXR (sous la forme d'un complexe hétérodimérique RXR/LXR) et donc de la concentration intracellulaire d'oxystérols (Laffitte et al., 2001). Mais, l'effet protecteur de l'apoE contre l'athérosclérose semble être régulé directement par le cholestérol, via l'AMPc (Santillo et al., 1999).

Comme l'apoA-I et l'apoB, l'apoE apparaît comme une protéine importante de la régulation du transport du cholestérol. L'étude de son expression dans le placenta apporterait probablement des informations supplémentaires sur l'apport maternel de cholestérol au fœtus. Quelques études appuient cette idée. En effet, l'apoE est synthétisée par le placenta et le sac vitellin pendant la grossesse (Rindler et al., 1991). Les concentrations d'apoE sont élevées dans ces tissus, suggérant que les lipoprotéines contenant l'apoE placentaire pourraient être une source d'approvisionnement fœtal en cholestérol (Elshourbagy et al., 1985b). De plus, un débalancement de l'apoA-I vers l'apoE sur les HDL dans le sang fœtal a été démontré (Nagasaka et al., 2002), suggérant que le rôle de l'apoE serait au niveau du transport inverse du cholestérol dans la circulation fœtale. Cependant, l'influence du cholestérol maternel sur l'expression de l'apoE placentaire n'a pas été étudiée.

1.3.4. Les autres apolipoprotéines

1.3.4.1. L'apolipoprotéines A-II

L'apoA-II est synthétisée dans le foie et dans l'intestin sous la forme d'une protéine de 16500 Da. C'est aussi un composé majeur des HDL. Cette protéine fait partie des apolipoprotéines interchangeables, mais ses fonctions ne sont pas encore bien définies (Blanco-Vaca et al., 2001). Il semble que l'apoA-II ait un rôle important dans le remodelage constant des HDL. Un caractère hydrophobe plus important pour l'apoA-II lui confère une meilleure affinité pour les phospholipides que l'apoA-I (Ibdah et al., 1989). L'apoA-II a un rôle dans le transport inverse du cholestérol, mais l'effet est moins marqué que pour l'apoA-I (Lund-Katz et al., 1996). Elle affecte également le rendement de LCAT et de la protéine de transfert des esters de cholestérol CETP (Durbin and Jonas, 1999; Guyard-Dangremont et al., 1994). En présence de l'apoA-II, l'estérification du cholestérol est moins importante et le transfert des esters de cholestérol est diminué (Blanco-Vaca et al., 2001). Le rôle de l'apoA-II dans l'athérosclérose est ambigu. L'apoA-II semble avoir des effets favorisant le développement de l'athérosclérose tout en ayant des fonctions protectrices vis-à-vis de cette pathologie (Tailleux et al., 2002).

1.3.4.2. Les apolipoprotéines C

Trois types majeurs d'apoCs ont été identifiés dans cette famille, l'apoC-I, l'apoC-II, l'apoC-III (Jong et al., 1999). Les trois gènes codant ces protéines ne sont pas sur le même chromosome (chromosome 19 pour l'apoC-I et l'apoC-II et chromosome 11 pour l'apoC-III). Elles sont synthétisées par le foie (Davison et al., 1986; Karathanasis, 1985; Smit et al., 1988) et elles sont présentes dans toutes les fractions lipoprotéiques. Les apoCs ont plusieurs rôles dans le métabolisme lipidique. Elles ont des effets différents sur les enzymes de ce métabolisme. L'apoC-I est un activateur de la LCAT et un inhibiteur de la CETP. Elle a également la capacité d'empêcher la liaison de l'apoE des VLDL avec le LDLR, le LRP et le récepteur aux VLDL. L'apoC-II est un inhibiteur de la LCAT et un activateur ou un

inhibiteur (effet dépendant de la concentration de l'apoC-II) de la LPL. L'apoC-III active la CETP, mais elle diminue l'activité de la LCAT, de la HL et de la LPL. Ces lipases sont importantes pour la maturation des lipoprotéines dans le sang. Le mécanisme d'action des apoCs mis en jeu semble être l'encombrement stérique de la lipoprotéine. Ainsi, elles influencent la présentation des ligands ou cofacteurs (généralement les autres apolipoprotéines) aux enzymes et aux récepteurs (Jong et al., 1999).

1.3.4.3. L'apolipoprotéine D

L'apoD est une protéine plasmatique de 28000 Da (Ayrault-Jarrier et al., 1963). La localisation du gène est variable selon les espèces, chez l'humain, le locus est situé sur le chromosome 3 (Drayna et al., 1987). L'ARNm de l'apoD est exprimé faiblement dans le foie et les intestins, par contre des niveaux plus importants sont retrouvés dans le cerveau, le pancréas, les reins, les ovaires, les testicules et le placenta (Boyles et al., 1990; Provost et al., 1991; Seguin et al., 1995). Dans le sang, l'apoD est surtout associée aux HDL (McConathy and Alaupovic, 1976; Vezina et al., 1988). La séquence du gène ne présente pas de similarité avec les autres apolipoprotéines (Drayna et al., 1986), mais elle contient des éléments de régulation pour les hormones stéroïdiennes (Lambert et al., 1993). Par contre, la structure de l'apoD comporte de fortes ressemblances avec celle des lipocalines. Ces dernières sont des transporteurs de protéines intervenant dans divers processus biologiques. L'apoD lie principalement les hormones stéroïdiennes, l'acide arachidonique et la bilirubine (Akerstrom et al., 2000). L'hypothèse d'une liaison avec le cholestérol a également été avancée, mais la littérature est controversée à ce sujet (Patel et al., 1997; Peitsch and Boguski, 1990). Cependant, l'apoD pourrait avoir un rôle dans le transport inverse du cholestérol (Steyrer and Kostner, 1988). L'apoD est très étudiée dans le cerveau. Comme l'apoE, l'expression de l'apoD est localisée dans des aires spécifiques du cerveau (Terrisse et al., 1999). De plus, elle semble également impliquée dans la régénération des neurones du système nerveux (Spreyer et al., 1990). L'apoD apparaît aussi comme un élément impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Terrisse et al., 1998; Thomas et al., 2003). L'expression de l'apoD dans le placenta pourrait être important pour le transport hormonal et/ou la formation du système nerveux. En effet,

Sanchez et al. (Sanchez et al., 2002) ont montré que l'apoD était exprimée dès le début de l'embryogenèse.

1.3.4.4. Les apolipoprotéines L

Quatre apoL ont été identifiées, dont les gènes sont localisés sur le chromosome 22. L'apoL-I et l'apoL-II sont plus exprimées que apoL-III et apoL-IV. La synthèse de ces protéines se fait dans plusieurs organes, mais le placenta apparaît comme étant l'organe qui en synthétise le plus après le foie. L'apoL-I et l'isoforme *b* de l'apoL-IV se retrouvent dans le milieu extracellulaire (dans toutes les fractions lipoprotéiques) alors que l'apoL-II, l'apoL-III et l'isoforme *a* de l'apoL-IV restent dans le milieu intracellulaire. Leur fonction n'a pas été déterminée. Mais il semble qu'elles aient un rôle dans le métabolisme lipidique puisque les gènes contiennent des éléments de réponse aux stérols. Elles semblent impliquées dans la sécrétion et le transport des lipides de même que dans le transfert des lipides entre les différentes lipoprotéines (Duchateau et al., 2000; Duchateau et al., 2001; Duchateau et al., 1997).

1.4. Buts du projet

Le transport des lipides par les apolipoprotéines fait partie intégrante du métabolisme lipidique. Le rôle des apolipoprotéines pendant la grossesse semble important puisqu'une partie du cholestérol fœtal provient de la circulation maternelle. L'expression des apolipoprotéines par le placenta est donc nécessaire pour mieux comprendre les échanges lipidiques entre la mère et son fœtus.

De plus, si l'on considère que l'apport maternel de lipoprotéines par le placenta affecte l'homéostasie du cholestérol chez le fœtus, que la grossesse est associée à une élévation du cholestérol maternel et qu'une élévation du cholestérol favorise la formation d'athérome, une question peut être posée. Est-il possible que, lors de la grossesse, tous les fœtus soient prédisposés à développer l'athérosclérose? Pourtant l'athérosclérose n'affecte pas toute la population. Ce projet vise à apporter plus d'information sur ce point. L'une des voies impliquée dans le transfert du cholestérol au fœtus est celle des apolipoprotéines placentaires. L'étude porte sur l'apoA-I, l'apoB et l'apoE qui représentent les trois apolipoprotéines indispensables au transport du cholestérol par les lipoprotéines. De plus elles sont souvent associées à l'athérosclérose. Une meilleure connaissance de leur régulation au niveau placentaire pourrait permettre de déterminer si le placenta est capable de contrôler l'apport de cholestérol maternel pour préserver la santé du fœtus en régulant les apolipoprotéines placentaires.

Ainsi, les hypothèses spécifiques de ce projet sont :

Le cholestérol maternel affecte la régulation des apolipoprotéines placentaires (apoA-I, apoB et apoE)

Des taux élevés de cholestérol maternels vont favoriser une augmentation du transfert de cholestérol par l'intermédiaire des lipoprotéines contenant l'apoB. Cette régulation pourrait favoriser le développement de l'athérosclérose au stade fœtal.

2. CHAPITRE II

ARTICLE

2.1. Contributions

L'article suivant a été rédigé et inséré dans le mémoire de recherche dans le cadre de la maîtrise en biologie de l'Université du Québec à Montréal.

Je soussigné, Perrier Laurent, certifie sur l'honneur avoir rédigé l'intégralité de cet article.

L'échantillonnage de la population, le suivi des patientes et les accouchements ont été effectués au sein de l'unité d'obstétrique de l'hôpital Saint Luc de Montréal sous la direction du Dr. A. Masse et ses collaborateurs. Tous les dosages sanguins ont été réalisés dans les laboratoires des Dr. Y. Giguère et J.C. Forest au sein de l'hôpital Saint François d'Assise de Québec. L'étude complète de l'expression des apolipoprotéines placentaires, ainsi que les analyses statistiques ont été réalisées par moi-même.

L'article suivant est présenté sous la forme exigée par l'université concernant, la taille et la forme de la police d'écriture, les espacements, les marges et le format de la bibliographie. Cependant la version soumise au journal *Biology of Reproduction* a été modifiée selon les exigences propres au journal.

Titre de l'article: INFLUENCE OF ELEVATED MATERNAL CHOLESTEROL ON APOLIPOPROTEIN A-1, B AND E EXPRESSION IN HUMAN PLACENTA AT TERM

Auteur principal L. Perrier

Collaborateurs : J.-C. Forest, Y. Giguère, A. Masse et J. Lafond

Directeur de la recherche : J. Lafond

2.2. Page de présentation

INFLUENCE OF ELEVATED MATERNAL CHOLESTEROL ON APOLIPOPROTEIN A-1, B AND E EXPRESSION IN HUMAN PLACENTA AT TERM

L. Perrier^{1,2}, J.-C. Forest³, Y. Giguère³, A. Masse⁴ and J. Lafond^{1,2,5}

¹Laboratoire de physiologie materno-fœtale, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8; ²Centre de Recherche Biomed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8; ³Saint-François d'Assise hospital (CHUQ), Quebec City, Québec, Canada, G1L 3L5, ⁴Saint-Luc hospital (CHUM), Montréal, Québec, Canada, H2X 3J4.

⁵To whom correspondence should be addressed:

Julie Lafond PhD ; Laboratoire de Physiologie Materno-Fœtale
Université du Québec à Montréal, Centre de Recherche BioMed
C.P. 8888, Succursale Centre-ville; Montréal, Canada H3C 3P8
Phone: (514) 987 3000 ext 7857; Fax: (514) 987 4647
Email: lafond.julie@uqam.ca

Key words : placenta, pregnancy, human, apolipoprotein, cholesterol, regulation

Abbreviations: ABCA1 : ATP Binding Cassette transporter A1; Apo : apolipoprotein; gp330 : glycoprotein 330; HC : higher median cholesterol; HDL : high density lipoprotein; HDL-C : high density lipoprotein-associated cholesterol; HNF : hepatic nuclear factor; IRCE : insulin response core element; LC : lower median cholesterol; LCAT : lecithin cholesterol acyltransferase; LDL : low density lipoprotein; LDL-C : low density lipoprotein-associated cholesterol; LDLR : low density lipoprotein receptor; LOX-1 : lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1; LRP : low density lipoprotein receptor-related protein; LXR : liver-X-receptor; MTP : microsomal triglyceride transfert protein; RXR : retinoid-X-receptor; SR-B1 : Scavenger Receptor class B type 1; SRE : sterol response element; TC : total cholesterol; TG : triglyceride; VLDL : very low density lipoprotein.

Manuscript submitted to *Biology of Reproduction* (September 2006)

2.3. ABSTRACT

Apolipoproteins (apos) are the most important structural and functional constituent of plasma lipoproteins. ApoA-I, apoB and apoE are associated with hypercholesterolemia and atherosclerosis in adults. Moreover, several studies suggested that fetal programming may play a role in the development of these diseases in adults. Thus, the regulation of placental apos by maternal cholesterol supply was investigated. In this study, 59 pregnant women were recruited and two class were established according maternal total cholesterol level, a lower median cholesterol class (LC) and a higher median cholesterol class (HC). After delivery, placental tissues were collected. RNA and proteins were extracted. Apos mRNA expression was evaluated by real time PCR and their protein levels were assayed by ELISA. Blood total cholesterol, low density lipoprotein-associated cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein-associated cholesterol (HDL-C), TG, apoA-I and apoB were also tested in mother and newborn blood. Our results showed a significant increase of maternal blood apoB (44%) and LDL-C (74%) in HC group compared to LC patients. In placental tissue extracts, only apoB increase in HC patients. Indeed, apoB protein level significantly increases by 49% in HC group. ApoB mRNA increases by 64% in placenta of HC group, even though this difference was not significantly different. However, we noted no variation in placental apoA-I and apoE levels in both mRNA and protein expression. In conclusion, high maternal total cholesterol upregulates only apoB in placenta without affecting apoA-I and apoE expression. This suggests that placental apolipoprotein B might be involved in fetal programming of atherosclerosis.

2.4. INTRODUCTION

Apolipoprotein A-I (apoA-I), B (apoB) and E (apoE) are important structural and functional constituent of plasma lipoproteins. These proteins allow cholesterol and triglycerides (TG) solubilization in blood. Their principal functions are lipids transport and redistribution among tissues through very low density lipoproteins (VLDL), low density lipoproteins (LDL) and high density lipoproteins (HDL) (Scanu, 1972).

ApoB exists primarily as two isoforms, apoB-100 and apoB-48. ApoB-100 is highly expressed in mammalian liver and is the principal component of LDL and VLDL (Davis, 1999). ApoB-48 is synthesized in small intestine and is the major component of chylomicrons (Kane et al., 1980). In hepatocytes-endoplasmic reticulum, apoB-100 mediates lipidation of VLDL (Davis, 1993). Furthermore, apoB secretion is regulated by the microsomal triglyceride transfer protein (MTP). In the circulation, removal of LDL is promoted by apoB-100 binding to LDL receptor (LDLR) which is expressed on cellular membranes. Then, entire LDL particle is incorporated into the cells and apoB-100 is integrally degraded (Brown and Goldstein, 1986). Thus, apoB-100 plays the major role in providing cholesterol supply to peripheral tissues. Another mechanism has to reestablish sterol balance, the reverse cholesterol transport, a process whereby excess cholesterol is transported from peripheral cells back into the liver where it will be degraded into biliary acids (Fielding et al., 1991). ApoA-I has crucial role in this process and is mainly associated with HDL (Schonfeld and Pfleger, 1974). Indeed, apoA-I promotes HDL assembly through ATP Binding Cassette transporter A1 (ABCA1) interaction (Yamauchi et al., 2004). Furthermore, apoA-I acts as a cofactor for the Lecithin Cholesterol Acyltransferase (LCAT) which is responsible of blood cholesterol esterification (Roosbeek et al., 2001). Finally, on hepatocytes membranes, the Scavenger Receptor class B type 1 (SR-B1) allowed HDL uptake into cells through apoA-I binding (de Beer et al., 2005). ApoE, another lipoprotein, is also involved in reverse cholesterol transport. ApoE is a constituent of chylomicron remnants, VLDL and HDL and is associated with TG metabolism. An important biochemical characteristic of human apoE stems from a genetic polymorphism (Utermann et al., 1980). Three major forms exist, designated apoE2, apoE3 and apoE4, arising from three alleles. ApoE3 is the most frequent isoform whereas apoE4 is found in a small part of population and is strongly associated with Alzheimer disease

(Strittmatter et al., 1993). ApoE role consists in removal of plasma cholesterol by mediating lipoprotein clearance from circulation. Indeed, apoE binds LDLR with high affinity (Fisher et al., 2000) and leads to lipoprotein uptake into cells. ApoE binds also to other lipoprotein receptors like SR-B1, VLDL receptor and LDL receptor-related protein (LRP) (Beisiegel et al., 1989; Herz and Bock, 2002; Thuahnai et al., 2003). Moreover, apoE plays a role in reverse cholesterol transport by acting as LCAT cofactor (Zhao et al., 2005). Thus, apoA-I and apoE are crucial for removal of cholesterol from cells.

Thus, apoA-I, apoB and apoE are responsible of cholesterol availability in human circulation. Hypercholesterolemia, one of the most frequent cholesterol disorder, is characterized by measuring plasma levels of apoB (Serougne et al., 1995). Higher levels of apoB lead to accumulation and oxydation of LDL-associated cholesterol (LDL-C). These oxydized LDL-C are removed from circulation by macrophages and monocytes through the lectin-like oxydized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). Thus, LDL-C and LOX-1 levels are involved in atherosclerosis development (Mehta et al., 2006). Inversely, apoA-I and apoE are designated as antiatherogenic factors because they decrease the cholesterol plasma levels (Belalcázar et al., 2003; Tsukamoto et al., 2000). Moreover, it is well established that apoE knock-out mouse is a suitable animal model for atherosclerosis studies. Eventhough apolipoproteins are involved in atherosclerosis development, another possible origin of the pathology is fetal programming (for review see reference (Palinski and Napoli, 2002)). As macromolecules, lipoproteins can not cross the placenta. Therefore, apolipoproteins are synthesized and secreted by the placenta and thus, provide cholesterol supply to the fetus (Madsen et al., 2004; Richardson et al., 1996; Rindler et al., 1991). However, little is known about human placental apolipoprotein regulation by maternal cholesterol levels. Therefore, the aims of this study was to evaluate the effect of maternal total cholesterol level during pregnancy on placental expression of apoA-I, apoB and apoE. We showed that maternal cholesterol level upregulates the expression of apoB in placenta while apoA-I and apoE remain unchanged.

2.5. MATERIALS AND METHODS

Population

The project included 160 pregnant patients of similar socio-economic situation. Prenatal care was established for all recruited women. Biologic and hematologic exams (1st trimester of pregnancy), ecography (16-18 weeks) and glycemic test for detecting gestational diabetes (26 weeks) were performed. Pregnant patients delivered at Saint-Luc Hospital of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Montréal, QC, Canada). The study was approved by the ethical committee of Saint-Luc Hospital and Université du Québec à Montréal (Montréal, QC, Canada). All subjects provided written informed consent. The exclusion criteria were regular or gestational diabetes, preeclampsia, hypertension, drug medication and complication during pregnancy or at delivery.

Population study classification

After screening for exclusion criteria, we chose arbitrarily 59 women. A classification according to mother TC was established. TC level was evaluated and population median was 6.36 mM. Two groups were created, a lower median cholesterol class (LC) represented by women with TC inferior to 6.36 mM ($n = 30$) and a higher median cholesterol class (HC) with patients with TC superior to 6.36 mM ($n = 29$).

Sampling procedures

At term, maternal blood, umbilical cord blood and placenta were collected. After centrifugation, plasma samples were frozen at -20°C until analysis. TC, HDL-associated Cholesterol (HDL-C), LDL-C and TG were assayed at Saint-François d'Assise Hospital in Quebec City by Unicel DXC600 Synchron Clinical system (Beckman-Coulter, Mississauga, ON, Canada) according to manufacturer's instructions. RIA or ELISA methods were performed on plasma apolipoproteins in the Clinical biochemistry laboratory of Centre Hospitalier Universitaire du Québec (CHUQ) in Quebec City. For placental tissue preparations, maternal and fetal membranes were excised; then, tissue samples were collected and were immediately frozen at -80°C.

Apolipoprotein mRNA analysis

Total RNA was extracted from 30 µg of placental tissues using RNeasy Tissue[®] kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) as per the manufacturer's instructions. cDNAs were then generated at 37°C for 1 hour using 2 µg RNA using the Omniscript Reverse Transcriptas kit[®] (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) with 10 µM random poly(dT) in a total volume of 20 µL. The real time PCR reactions (lightCycler[®], Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) were performed in the presence of 0.5 µM of each primer using SYBR[®] premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan), following the manufacturer's instructions. A negative control without cDNA was carried out for each set of reaction. Specific primer pairs were designed with Primer Premier[®] 5.0 software (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) and each one was checked with BLAST analysis for specificity. In order to exclude the possibility of genomic DNA amplification, primers were intron spanning. Primers were designed for ApoA1, ApoB, ApoE and β -2-microglobulin as internal control (see table I). All PCR reactions were performed at 59°C for 40 cycles. Dissociation curves were run on all genes to ensure amplification of a single product with the appropriate melting temperature (data not shown). Dissociation curves and coefficient files were used for quantification studies with the RelQuant[®] software version 1.01 (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada).

Placental apolipoprotein quantification

Aliquots of tissue were weighted and total proteins were extracted with a mechanical homogenizer using hypertonic buffer containing Tris-HCL (125 mM, pH 8), CaCl₂ (2 mM), Triton X-100 (1.4% v/v), PMSF (1 mM), Leupeptin (1 µM), Pepstatin (1.46 µM). Total protein quantification was performed by BCA method using Micro BCA Protein Assay kit[®] following the manufacturer instructions (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). Apolipoproteins protein levels were assayed by ELISA according to manufacturer's instructions. Total Human Apolipoprotein A1 ELISA Assay[®] and Total Human Apolipoprotein B ELISA Assay[®] were purchased from AlerCheck Portland (ME, USA) and ApoE4/Pan-ApoE ELISA kit[®] from Medical and Biological Laboratories CO. (Naka-ku, Nagoya, Japan) samples were diluted 1/1000, 1/100 and 1/50 before proceeding with the assay.

Statistical Analysis

Data were expressed as means $\pm$ SEM except for clinical variables : gestational age, pre-pregnancy body mass index (BMI), weight gain (WG) during pregnancy and newborn weight) which are expressed as means $\pm$ SD. Data were analyzed with *t*-test and correlation coefficients were calculated with Pearson test. Results were considered significant at *p* values < 0.05 . All statistical analysis were performed using Prism 4.0[®] (GaphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.6. ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by Canadian Institutes for Health Research (CIHR). We acknowledge the contribution of the service of nurses and obstetrics of Hopital Saint-Luc-Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (HSL-CHUM).

2.7. RESULTS

Subject characteristics

Population study was composed of 59 pregnant women. Subjects were classified according maternal TC to generate 2 groups, a control group with lower TC level ($n = 30$), called LC, and HC which represented a high TC group ($n = 29$). Maternal and newborn blood lipids profiles are shown in table II. No variation was observed within this classification in gestational age and maternal WG during pregnancy. However, mother pre-pregnancy BMI was significantly lower when mother TC was elevated. Indeed, BMI was $23.11 \pm 4.21 \text{ kg/m}^2$ in LC group and $20.64 \pm 3.28 \text{ kg/m}^2$ in HC group. Mother's TC, criteria of classification, significantly increased by 41%, from $5.53 \pm 0.13 \text{ mM}$ in LC group to 7.80 ± 0.18 . As expected, elevated maternal TC led to significantly higher maternal LDL-C and apoB levels (74% and 44% respectively). Indeed, maternal LDL-C level increased in patients of HC group, from $2.62 \pm 0.12 \text{ mM}$ to $4.56 \pm 0.15 \text{ mM}$ compared to LC patients. Maternal blood apoB level raised from $1.09 \pm 0.03 \text{ g/L}$ in LC group to $1.57 \pm 0.05 \text{ g/L}$. Furthermore, elevated maternal TC showed no variation neither in maternal TG, HDL-C and apoA-I levels nor newborn blood lipid profile.

Effects of maternal TC level on apolipoprotein expression

In order to see how maternal TC level affects placental apolipoproteins expression, real time PCR were performed on cDNA obtained from total RNA of placental tissue extraction ($n=20$). Our results showed no significant difference in apoA-I and apoE mRNA between LC and HC group (figure 1.A and 3.A). However, an increase in placental apoB mRNA level (64%) was detected in HC group compared to LC group, even though this difference was not significant (figure 2.A). Then, placental apolipoproteins protein levels were investigated by ELISA ($n=59$). Like mRNA expression, apoA-I and apoE protein level remain unchanged as shown in figure 1.B and 3.B. However, placental apoB protein level followed mRNA expression. Indeed, apoB level significantly rose from $11.40 \pm 0.85 \text{ } \mu\text{g/mg}$ tissue in LC group to $17.08 \pm 1.25 \text{ } \mu\text{g/mg}$ tissue in HC group (figure 2.B). This difference in apoB represented an increase of 49% compared to control.

Apolipoprotein correlations with lipid variables

Placental apolipoprotein protein levels ($n = 59$) were assayed for correlation with clinical and biochemical characteristics in the mother and newborn using Pearson correlation coefficient (table III). ApoA-I was positively correlated with placental apoA-I mRNA expression. However, no significant correlations were observed between apoA-I and other variables. As expected, apoB level was positively correlated with maternal TC and LDL-C. Moreover, significant positive correlations were also found between placental apoB and maternal blood TG and apoB. Furthermore, newborn blood TG and apoB levels were positively correlated with placental apoB protein level. ApoE was only positively correlated with newborn blood TG ($p < 0.001$). Other blood variables appeared to be independent of apoE protein level in placenta.

2.8. DISCUSSION

In this study, we focused on the regulation of apoA1, B and E expression in the human placenta by maternal blood cholesterol in order to study their effect on cholesterol transport between the mother and the fetus. Subjects were divided into two groups, low and high cholesterol levels (LC and HC respectively). We expected an increase of cholesterol transport to the fetus in HC compared to LC. Maternal TC difference between LC and HC groups was highly significant as shown in table II. However, no significant variation was observed between the two groups in newborn blood lipids and apolipoproteins. Previous studies showed no correlation between maternal and fetal cholesterol level near to term (Khoury et al., 2005; Napoli et al., 1997). Moreover, mother and newborn clinical factors were not affected by elevated maternal blood TC, except for pre-gregnancy BMI. However, according to the March of Dimes recommendations, normal BMI varies from 18.5 to 24.9 kg/m² (March of Dimes, 2005). In this study, the BMI values of both groups are included in this range and therefore this variation is clinically not significant. Moreover, several studies showed no relation between prepregnancy BMI and maternal blood cholesterol rate (Ramsay et al., 2002; Silliman and Kretchmer, 1995). Thus, this suggests that BMI decrease in HC group was not related to TC level in pregnant women. However, maternal TC strongly promoted LDL in maternal circulation by increasing LDL-C (74%) and apoB (44%). Indeed, high level of apoB in hypercholesterolemic animals was reported in numerous studies (Dhingra and Bansal, 2005; Srivastava et al., 1991). Moreover, Abraham et al. (Abraham et al., 1993) showed that animals fed with atherogenic diet developed hypercholesterolemia probably by increasing synthesis of apoB in hepatocytes and by promoting secretion of lipoproteins associated with apoB. These results are consistent with our study. Indeed, results showed in figure 2.B demonstrated placental apoB upregulation in HC group. Furthermore, we showed a positive correlations between placental apoB level and maternal blood TC, LDL-C and apoB. Thus, our results suggest that maternal cholesterol excess might be incorporated into LDL particles through increasing apoB synthesis in placenta and therefore, high LDL-apoB could be a responsible for fetal atherosclerosis developement.

One mechanism of apoB regulation by TC could be through MTP. Indeed, this protein is responsible of apoB segregation in the cell and MTP binding to apoB regulates apoB

translocation. Moreover, low MTP level enhances presecretory apoB degradation and therefore apoB segregation by MTP regulates the rate of apoB secretion into circulation (Adeli et al., 1995; Benoist and Grand-Perret, 1997). Furthermore, Tietge et al. (Tietge et al., 1999) showed an increase in apoB by hepatic MTP overexpression. Moreover, two studies demonstrated that liver MTP was upregulated in cholesterol fed hamster compared to normal diet (Bennett et al., 1996; Hagan et al., 1994). This regulation might be induced at a transcriptional level since MTP gene contains a modified sterol response element (SRE). Madsen et al. (Madsen et al., 2004) showed MTP expression in human placenta and therefore, we can hypothesized that maternal TC can induce MTP expression through SRE activation. Thereafter, MTP might promote increase of apoB translocation and initiation of apoB-rich lipoprotein assembly (VLDL and LDL). Further investigations are needed to clarify this hypothesis.

Eventhought maternal cholesterol showed substantial apoB increase in placenta of HC group compared to LC, our results showed no effect on placental ApoA-I and apoE expression. Interestingly, maternal blood HDL-C and apoA-I levels remain unchanged in both groups (table II). Moreover, although a positive correlation was observed between placental apoA-I mRNA and apoA-I protein level (table III), our results showed no variation in placental apoA-I expression between LC and HC groups (figure 1.A and 1.B). Our results are different from other study where a significant elevation of dams TG, HDL-C and apoA-I levels was observed in hypercholesterolemic fed hamsters (McConihay et al., 2001). In our study, exclusion of severe pathologic (hypercholesterolemic) patients during recruitment could explain this difference and consequently, variation in maternal TC level between groups might not be enough strong to promote significant increase in TG, HDL-C and apoA-I. Moreover, pregnancy is associated with endocrine system exacerbation and several hormones seem to regulate apoA-I gene, including steroid hormones, thyroid hormones, retinoids and insuline (for review, see (Hargrove et al., 1999)). Moreover, ApoA-I gene promoter contains hepatic nuclear factor (HNF) binding sequences. These transcriptional factors are involved in estradiol and glucocorticoids signalisation pathway. Furthermore, Punnonen et al. (Punnonen, 1977) demonstrated a positive correlation between maternal TC and estradiol. Thus, high maternal TC might promote placental apoA-I expression through steroid hormones metabolism alteration. Moreover, Murao et al. (Murao et al., 1998) showed that glucose can

downregulate apoA-I gene expression in HepG2 cells. In addition, high endocrine activity during late pregnancy results in insulin resistance. This allows higher glucose transport to the placenta and the fetus and therefore can downregulate placental apoA-I expression. Thus, placental apoA-I upregulation by steroid hormones and downregulation by glucose can explain our results.

Furthermore, as shown in figure 3.A and 3.B no variation in apoE gene or protein expression was observed between LC and HC groups. Several studies showed that hypercholesterolemia had no effect on apoE gene transcription in liver of rodents (Apostolopoulos et al., 1987; Reue et al., 1984; Serougne et al., 1995). In addition, the same conclusion was reported in HepG2 cells loaded with LDL (Kraft et al., 1992). However, numerous studies reported apoE upregulation in macrophages and hepatocytes of hypercholesterolemic rats (Mazzone et al., 1989; Santillo et al., 1999). Furthermore, hormonal regulation of apoE expression in placenta can be suggested since Beckmann et al (Beckmann et al., 1991) observed a downregulation of apoE in cultured human granulosa cells by progesterone. Nevertheless, apoE is usually associated with TG metabolism and this is consistent with our results. Indeed, although placental apoE was not associated with maternal blood TG, it was correlated with newborn TG (table III). Thus, as maternal hypercholesterolemia has no influence on placental apoA-I and apoE metabolism, placental reverse cholesterol transport might play a minor role in placental cholesterol metabolism.

In conclusion, we have demonstrated that maternal TC regulates placental apoB expression. Indeed, placental apoB expression was increased in hypercholesterolemic subjects and this regulation might be controlled by MTP. Moreover, a compensatory action of reverse cholesterol transport appeared to be absent since no variation of placental apoA-I and apoE expression was observed in hypercholesterolemic mothers. Therefore, further investigations are needed to study apoA-I- and apoE regulation by endocrine system activity during pregnancy. Finally, increasing apoB secretion in fetal circulation might promote LDL oxydation susceptibility and, if placental reverse cholesterol transport or catabolism was decreased, maternal hypercholesterolemia could promote fetal atherosclerosis developement.

2.9. REFERENCES

- Abraham, R., Kumar, N. S., Kumar, G. S., Sudhakaran, P. R. and Kurup, P. A. (1993) Synthesis and secretion of apo B containing lipoproteins by primary cultures of hepatocytes isolated from rats fed atherogenic diet. *Atherosclerosis* 100, 75-83.
- Adeli, K., Mohammadi, A. and Macri, J. (1995) Regulation of apolipoprotein B biogenesis in human hepatocytes: posttranscriptional control mechanisms that determine the hepatic production of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Clin Biochem* 28, 123-30.
- Apostolopoulos, J. J., Howlett, G. J. and Fidge, N. (1987) Effects of dietary cholesterol and hypothyroidism on rat apolipoprotein mRNA metabolism. *J Lipid Res* 28, 642-8.
- Beckmann, M. W., Olson, L. M. and Schreiber, J. R. (1991) Apolipoprotein E synthesis by cultured human ovarian granulosa cells: regulation by human chorionic gonadotropin and cholesterol. *Fertil Steril* 55, 1118-25.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. and Stanley, K. K. (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341, 162-4.
- Belalcázar, L. M., Merched, A., Carr, B., Oka, K., Chen, K. H., Pastore, L., Beaudet, A. and Chan, L. (2003) Long-term stable expression of human apolipoprotein A-I mediated by helper-dependent adenovirus gene transfer inhibits atherosclerosis progression and remodels atherosclerotic plaques in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *Circulation* 107, 2726-32.
- Bennett, A. J., Bruce, J. S., Salter, A. M., White, D. A. and Billett, M. A. (1996) Hepatic microsomal triglyceride transfer protein messenger RNA concentrations are increased by dietary cholesterol in hamsters. *FEBS Lett* 394, 247-50.
- Benoist, F. and Grand-Perret, T. (1997) Co-translational degradation of apolipoprotein B100 by the proteasome is prevented by microsomal triglyceride transfer protein. Synchronized translation studies on HepG2 cells treated with an inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* 272, 20435-42.

- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
- Davis, R. A. (1993) The endoplasmic reticulum is the site of lipoprotein assembly and regulation of secretion. *Subcell Biochem* 21, 169-87.
- Davis, R. A. (1999) Cell and molecular biology of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by the liver. *Biochim Biophys Acta* 1440, 1-31.
- de Beer, M. C., van der Westhuyzen, D. R., Whitaker, N. L., Webb, N. R. and de Beer, F. C. (2005) SR-BI-mediated selective lipid uptake segregates apoA-I and apoA-II catabolism. *J Lipid Res* 46, 2143-50.
- Dhingra, S. and Bansal, M. P. (2005) Hypercholesterolemia and apolipoprotein B expression: regulation by selenium status. *Lipids Health Dis* 4, 28.
- Fielding, P. E., Miida, T. and Fielding, C. J. (1991) Metabolism of low-density lipoprotein free cholesterol by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 30, 8551-7.
- Fisher, C. A., Narayanaswami, V. and Ryan, R. O. (2000) The lipid-associated conformation of the low density lipoprotein receptor binding domain of human apolipoprotein E. *J Biol Chem* 275, 33601-6.
- Hagan, D. L., Kienzle, B., Jamil, H. and Hariharan, N. (1994) Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. Cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J Biol Chem* 269, 28737-44.
- Hargrove, G. M., Junco, A. and Wong, N. C. (1999) Hormonal regulation of apolipoprotein AI. *J Mol Endocrinol* 22, 103-11.
- Herz, J. and Bock, H. H. (2002) Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem* 71, 405-34.

- Kane, J. P., Hardman, D. A. and Paulus, H. E. (1980) Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2465-9.
- Khoury, J., Henriksen, T., Christophersen, B. and Tonstad, S. (2005) Effect of a cholesterol-lowering diet on maternal, cord, and neonatal lipids, and pregnancy outcome: a randomized clinical trial. *Am J Obstet Gynecol* 193, 1292-301.
- Kraft, H. G., Demosky, S. J., Jr., Schumacher, K., Brewer, H. B., Jr. and Hoeg, J. M. (1992) Regulation of LDL receptor, apoB, and apoE protein and mRNA in Hep G2 cells. *DNA Cell Biol* 11, 291-300.
- Madsen, E. M., Lindegaard, M. L., Andersen, C. B., Damm, P. and Nielsen, L. B. (2004) Human placenta secretes apolipoprotein B-100-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 279, 55271-6.
- March of Dimes (2005) Maternal obesity and pregnancy : weight matters.
- Mazzone, T., Basheeruddin, K. and Poulos, C. (1989) Regulation of macrophage apolipoprotein E gene expression by cholesterol. *J Lipid Res* 30, 1055-64.
- McConihay, J. A., Horn, P. S. and Woollett, L. A. (2001) Effect of maternal hypercholesterolemia on fetal sterol metabolism in the Golden Syrian hamster. *J Lipid Res* 42, 1111-9.
- Mehta, J. L., Chen, J., Hermonat, P. L., Romeo, F. and Novelli, G. (2006) Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res* 69, 36-45.
- Murao, K., Wada, Y., Nakamura, T., Taylor, A. H., Mooradian, A. D. and Wong, N. C. (1998) Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A-I gene expression. *J Biol Chem* 273, 18959-65.

- Napoli, C., D'Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G. and Palinski, W. (1997) Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 100, 2680-90.
- Palinski, W. and Napoli, C. (2002) The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *Faseb J* 16, 1348-60.
- Punnonen, R. (1977) The relationship between serum oestradiol levels and serum triglyceride, cholesterol and phospholipid levels in normal human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 84, 838-45.
- Ramsay, J. E., Ferrell, W. R., Crawford, L., Wallace, A. M., Greer, I. A. and Sattar, N. (2002) Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4231-7.
- Reue, K. L., Quon, D. H., O'Donnell, K. A., Dizikes, G. J., Fareed, G. C. and Lusis, A. J. (1984) Cloning and regulation of messenger RNA for mouse apolipoprotein E. *J Biol Chem* 259, 2100-7.
- Richardson, B., Palgunachari, M. N., Anantharamaiah, G. M., Richards, R. G., Azrolan, N., Wiginton, D. and Handwerger, S. (1996) Human placental tissue expresses a novel 22.7 kDa apolipoprotein A-I-like protein. *Biochemistry* 35, 7580-5.
- Rindler, M. J., Traber, M. G., Esterman, A. L., Bersinger, N. A. and Dancis, J. (1991) Synthesis and secretion of apolipoprotein E by human placenta and choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 12, 615-24.
- Roosbeek, S., Vanloo, B., Duverger, N., Caster, H., Breyne, J., De Beun, I., Patel, H., Vandekerckhove, J., Shoulders, C., Rosseneu, M. and Peelman, F. (2001) Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* 42, 31-40.

- Santillo, M., Migliaro, A., Mondola, P., Laezza, C., Damiano, S., Stingo, S., Fiorentino, L., Andreozzi, A., Vitale, M. and Bifulco, M. (1999) Dietary and hypothyroid hypercholesterolemia induces hepatic apolipoprotein E expression in the rat: direct role of cholesterol. *FEBS Lett* 463, 83-6.
- Scanu, A. M. (1972) Structure of human serum lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci* 195, 390-406.
- Schonfeld, G. and Pfleger, B. (1974) The structure of human high density lipoprotein and the levels of apolipoprotein A-I in plasma as determined by radioimmunoassay. *J Clin Invest* 54, 236-46.
- Serougne, C., Felgines, C., Ferezou, J., Hajri, T., Bertin, C. and Mazur, A. (1995) Hypercholesterolemia induced by cholesterol- or cystine-enriched diets is characterized by different plasma lipoprotein and apolipoprotein concentrations in rats. *J Nutr* 125, 35-41.
- Silliman, K. and Kretchmer, N. (1995) Maternal obesity and body composition of the neonate. *Biol Neonate* 68, 384-93.
- Srivastava, R. A., Jiao, S., Tang, J. J., Pfleger, B. A., Kitchens, R. T. and Schonfeld, G. (1991) In vivo regulation of low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein B gene expressions by dietary fat and cholesterol in inbred strains of mice. *Biochim Biophys Acta* 1086, 29-43.
- Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D. and Roses, A. D. (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8098-102.
- Thuahnai, S. T., Lund-Katz, S., Anantharamaiah, G. M., Williams, D. L. and Phillips, M. C. (2003) A quantitative analysis of apolipoprotein binding to SR-BI: multiple binding sites for lipid-free and lipid-associated apolipoproteins. *J Lipid Res* 44, 1132-42.
- Tietge, U. J., Bakillah, A., Maugeais, C., Tsukamoto, K., Hussain, M. and Rader, D. J. (1999) Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in increased in vivo secretion of VLDL triglycerides and apolipoprotein B. *J Lipid Res* 40, 2134-9.

- Tsukamoto, K., Tangirala, R. K., Chun, S., Usher, D., Pure, E. and Rader, D. J. (2000) Hepatic expression of apolipoprotein E inhibits progression of atherosclerosis without reducing cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. *Mol Ther* 1, 189-94.
- Utermann, G., Langenbeck, U., Beisiegel, U. and Weber, W. (1980) Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet* 32, 339-47.
- Yamauchi, Y., Chang, C. C., Hayashi, M., Abe-Dohmae, S., Reid, P. C., Chang, T. Y. and Yokoyama, S. (2004) Intracellular cholesterol mobilization involved in the ABCA1/apolipoprotein-mediated assembly of high density lipoprotein in fibroblasts. *J Lipid Res* 45, 1943-51.
- Zhao, Y., Thorngate, F. E., Weisgraber, K. H., Williams, D. L. and Parks, J. S. (2005) Apolipoprotein E is the major physiological activator of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) on apolipoprotein B lipoproteins. *Biochemistry* 44, 1013-25.

2.12. FIGURE LEGENDS

Table I: Apolipoprotein primers designed for real time PCR assays.

Apo : apolipoprotein, Gi : GeneBank accession number.

Table II: Clinical and biochemical characteristics of the studied population according to maternal plasma cholesterol level. Results are expressed as means $\pm$ SD for clinical variables and means $\pm$ SEM for biochemical variables, where differences are significant for $p < 0.05$ ($n = 59$).

Apo : Apolipoprotein, BMI : Body Mass Index, HDL-C : HDL-associated Cholesterol, LDL-C : LDL-associated Cholesterol, TC : Total Cholesterol, TG : Triglycerides, WG : Weight Gain.

Table III: Associations of placental apolipoproteins ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue) with clinical and biochemical variables in mothers, newborns and placentas. Correlations are significative for $p < 0.05$ ($n = 59$).

Figure 1: Effect of maternal total cholesterol level on human placental ApoA-I expression. **A)** Two-step real time PCR was performed on total RNA using specific primers for apoA-I as described in materials and methods. β -2 microglobulin was used as housekeeping gene. Data are expressed as relative expression compared to LC group ($n=10$ for LC and 10 for HC). **B)** Protein levels were determined by ELISA as described in materials and methods. Data are expressed in μg of apoA-I/mg of tissue $\pm$ SEM ($n=30$ for LC and 29 for HC).

HC: Higher median Cholesterol, LC: Lower median Cholesterol.

Figure 2: Effect of maternal total cholesterol level on human placental ApoB expression.

A) Two-step real time PCR was performed on total RNA using specific primers for apoB as described in materials and methods. β -2 microglobulin was used as housekeeping gene. Data are expressed as relative expression compared to LC group ($n=10$ for LC and 10 for HC).

B) Protein levels were determined by ELISA as described in materials and methods. Data are expressed in mg of apoB/mg of tissue $\pm$ SEM ($n=30$ for LC and 29 for HC). *** $p < 0.001$ compared to LC group

Figure 3: Effect of maternal total cholesterol level on human placental ApoE expression.

A) Two-step real time PCR was performed on total RNA using specific primers for apoE as described in materials and methods. β -2 microglobulin was used as housekeeping gene. Data are expressed as relative expression compared to LC group ($n=10$ for LC and 10 for HC).

B) Protein levels were determined by ELISA as described in materials and methods. Data are expressed in μg of apoE/mg of tissue $\pm$ SEM ($n=30$ for LC and 29 for HC).

Table 1

Gene	GI	Sens	Antisens
ApoA-1	4557320	5'CGACTTCCAGAGAAGAAGTGGCA3'	5'CGTTCTCCTTGAGAGGCTTCAAG3'
ApoB	4502152	5'TCTGGCTTGGTAACCTCTCTG3'	5'CTGGAACTTCACGTCGATATC3'
ApoE	48762938	5'TTGGCTGGTCACATTCCTGG3'	5'GTTCCCTCCAGTTCGGAATTG3'
β-2-microglobulin	21619743	5'ATCCAGCGTACTCCAAAGA3'	5'GACCAAGTCTGAATGCTCCAC3'

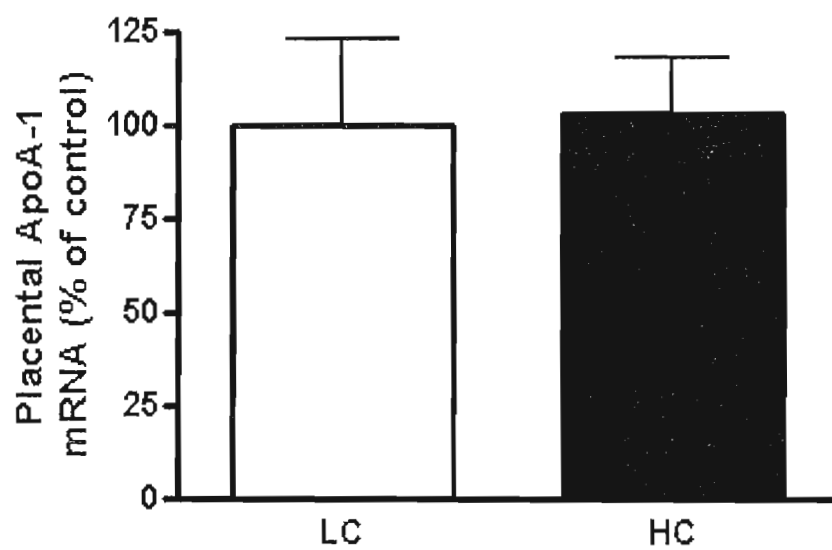
2.13.FIGURES

Table II

CHOLESTEROL LEVEL	LC (n=30)	HC (n=29)	<i>p</i> value
MOTHER			
Gestational age (weeks)	38.90 ± 1.37	39.34 ± 1.70	0.272
BMI (kg/m ²)	23.11 ± 4.21	20.64 ± 3.28	0.015
WG (kg)	15.56 ± 5.13	17.11 ± 5.71	0.277
TC (mM)	5.53 ± 0.13	7.80 ± 0.18	<0.001
LDL-C (mM)	2.62 ± 0.12	4.56 ± 0.15	<0.001
HDL-C (mM)	1.67 ± 0.07	1.84 ± 0.10	0.170
TG (mM)	2.70 ± 0.19	3.19 ± 0.22	0.102
ApoA-I (g/L)	2.05 ± 0.06	2.20 ± 0.08	0.141
ApoB (g/L)	1.09 ± 0.03	1.57 ± 0.05	<0.001
NEWBORN			
Weight (g)	3294.5 ± 471.3	3395.0 ± 485,5	0.421
TC (mM)	1.72 ± 0.09	1.69 ± 0.09	0.790
LDL-C (mM)	0.76 ± 0.05	0.68 ± 0.06	0.313
HDL-C (mM)	0.71 ± 0.05	0.72 ± 0.06	0.905
TG (mM)	0.55 ± 0.05	0.62 ± 0.07	0.406
ApoA-I (g/L)	0.81 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.574
ApoB (g/L)	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.342

Figure 1

A



B

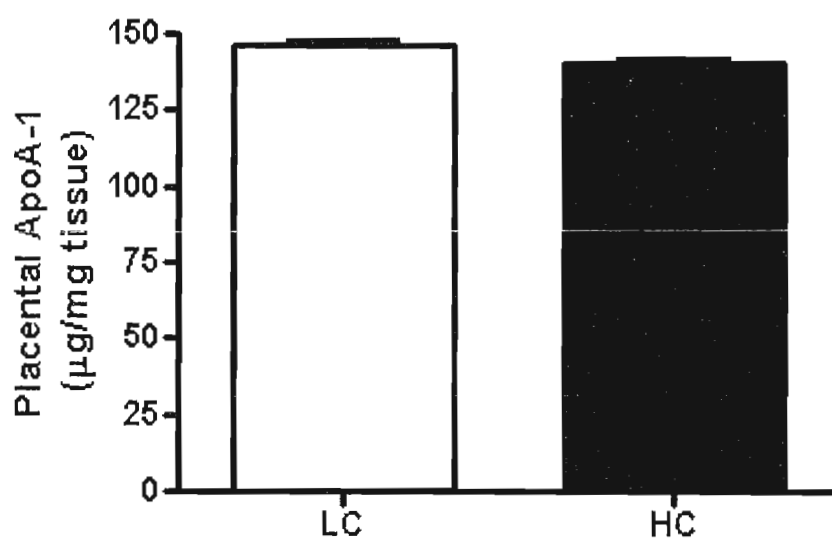
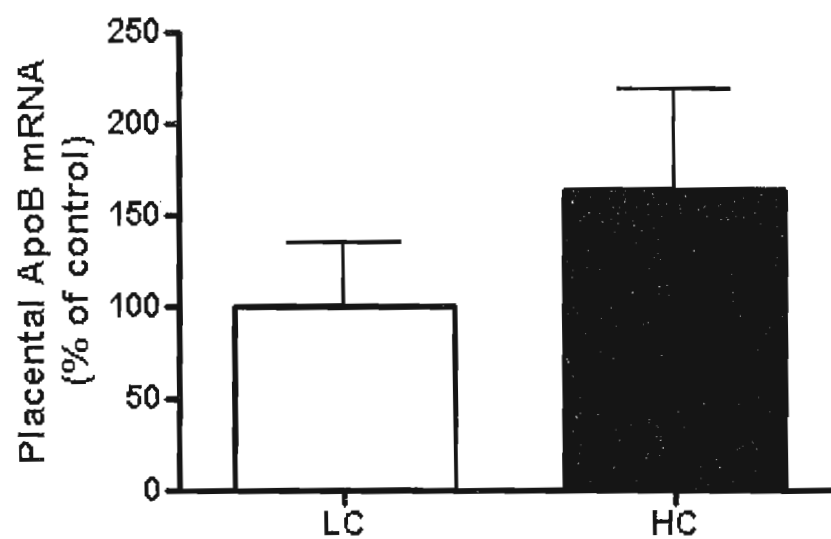


Figure 2

A



B

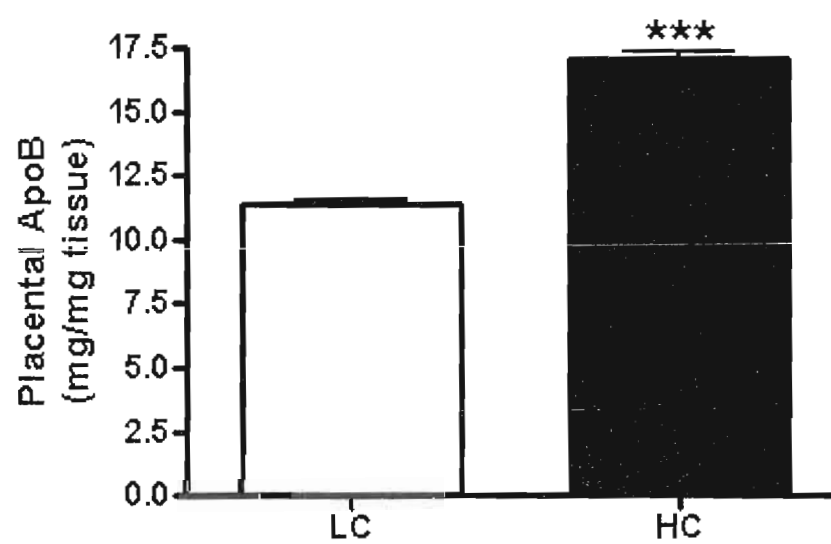
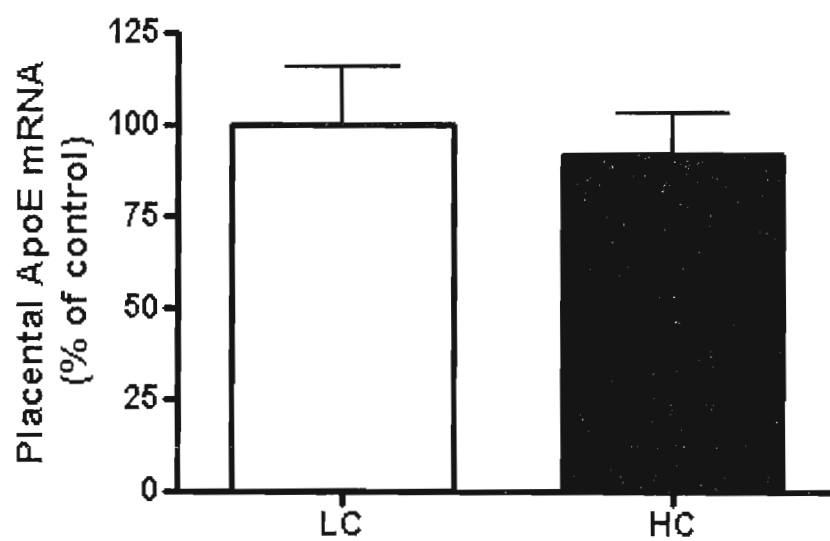
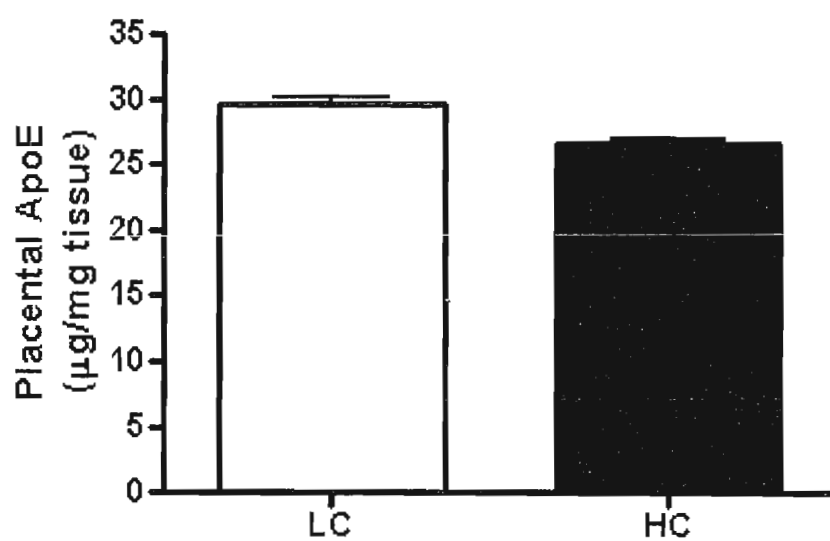


Figure 3

A



B



3. CHAPITRE III

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ce projet avait pour objectif de démontrer l'effet du cholestérol maternel sur l'expression des apolipoprotéines placentaires. En utilisant la technique de polymérisation en chaîne en temps réel et le dosage immuno-enzymatique nous avons montré que le cholestérol total maternel pouvait réguler différemment l'expression des apolipoprotéines placentaires. En effet, l'hypercholestérolémie maternelle affecte de manière non négligeable l'expression de l'apoB sans influencer l'expression de l'apoA-I ni de l'apoE.

Nous nous attendions à ce que l'apoA-I et l'apoE soient régulées à la hausse dans le placenta des femmes ayant un taux élevé de cholestérol total. En effet, ces deux apolipoprotéines sont associées au HDL et au transport inverse de cholestérol. Elles ont pour fonction de diminuer le cholestérol en circulation. Or, ni l'expression placentaire de l'apoA-I ni celle de l'apoE n'ont été altérées chez les femmes hypercholestérolémiques et cela, que ce soit au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Nos résultats suggèrent donc que l'apoA-I et l'apoE ne sont pas régulées au niveau de leur synthèse par le cholestérol maternel.

La littérature reconnaît que l'apoA-I est assujettie à une régulation par le transporteur ABCA1, lui-même dépendant des concentrations de cholestérol intracellulaire. Étudier l'influence de l'hypercholestérolémie maternelle sur la régulation de ce transporteur dans le placenta permettrait une meilleure compréhension du métabolisme de l'apoA-I dans cet organe. De plus, plusieurs études ont montré l'implication des hormones stéroïdiennes dans la régulation positive de l'expression de l'apoA-I. Mais l'augmentation de l'activité endocrinienne pendant la grossesse coïncide avec l'augmentation du transfert du glucose au fœtus. Or, le glucose est un répresseur de l'apoA-I. Il serait donc intéressant d'évaluer l'influence des hormones stéroïdiennes et du glucose sur l'expression de l'apoA-I placentaire chez les femmes hypercholestérolémiques.

Il est également reconnu que l'apoE est sensible aux hormones stéroïdiennes. De plus, dans les macrophages, dont le rôle dans l'athérosclérose est déterminant, l'expression de l'apoE est régulée par le cholestérol extracellulaire. Pourtant, aucune variation dans l'expression placentaire de l'apoE n'a été observée chez les femmes ayant un taux élevé de cholestérol dans la circulation. Cependant, une étude a montré que la cellule était capable de recycler l'apoE dans de nouvelles lipoprotéines, ce qui pourrait expliquer nos résultats. Mais l'existence de ce mécanisme dans le placenta reste à prouver.

Contrairement à l'apoA-I et à l'apoE, l'apoB placentaire est régulée à la hausse par le cholestérol maternel. Bien que le niveau de transcription de l'ARNm de l'ApoB tende à augmenter, la régulation principale semble s'effectuer au niveau de la post-transcription, ce qui est en accord avec la littérature bien que ces études aient été réalisées dans les hépatocytes. Un des mécanismes probables pourrait être l'augmentation de l'activité de la protéine responsable de l'édition de l'ARNm et de la lipidation de l'apoB dans le réticulum endoplasmique. En effet, la MTP détermine la quantité d'apoB intracellulaire en régulant la ségrégation de cette dernière. De plus, la MTP est dépendante de la concentration de cholestérol intracellulaire. Mais le mécanisme n'a pas encore été démontré dans le placenta, même si la MTP a été identifiée dans cet organe. Cependant, comme les autres apolipoprotéines, l'apoB subit aussi une régulation par les hormones stéroïdiennes, ainsi, un autre mécanisme potentiel de régulation de l'apoB placentaire par le cholestérol peut être envisagé.

Mon projet a donc permis de démontrer que l'hypercholestérolémie maternelle régule différemment l'expression des apolipoprotéines placentaires. L'excès de cholestérol maternel augmente l'expression de l'apoB au niveau de la post-transcription sans affecter l'apoA-I et l'apoE. Comme les concentrations intracellulaires d'apoB sont directement reliées aux concentrations d'apoB et de LDL dans la circulation, il semble que le cholestérol maternel en excès soit préférentiellement incorporé dans les LDL. Or, l'élévation de la concentration d'apoB dans le sang est un marqueur précoce du développement de l'athérosclérose. Il est donc possible d'envisager que l'augmentation de la production d'apoB placentaire, causée

par une hypercholestérolémie maternelle, puisse être un des facteurs conduisant au développement de lésions athérosclérotiques après la naissance.

Cependant, pour confirmer cette hypothèse, plusieurs points doivent être éclaircis. L'étude de l'expression placentaire des transporteurs comme l'ABCA1 et la MTP est nécessaire pour comprendre comment les lipides sont incorporés sur les apolipoprotéines du placenta. De plus, les activités des enzymes clés du métabolisme du cholestérol doivent être déterminées pour évaluer l'influence du cholestérol maternel sur la biosynthèse et le catabolisme du cholestérol dans le placenta. Ensuite, l'étude, dans le placenta, des différents récepteurs aux LDL (LDLR et LOX1) est indispensable puisque ce sont également des éléments importants dans le développement de l'athérosclérose. Puis, il semble que les apolipoprotéines soient toutes influencées par le système endocrinien, notamment les hormones stéroïdiennes. Par conséquent, l'influence de ces dernières sur le métabolisme des apolipoprotéines du placenta reste à déterminer. Ce dernier point est d'autant plus important que le cholestérol est l'élément précurseur de ces hormones et que l'activité hormonale durant la grossesse est très importante. Enfin, les apolipoprotéines sont interchangeable mis à part l'apoB, de plus elles ont toutes un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines. L'étude des autres apolipoprotéines dans le placenta s'avère indispensable pour comprendre le métabolisme des lipoprotéines dans son intégralité.

4. CHAPITRE IV

BIBLIOGRAPHIE

- Abildayeva, K., Jansen, P. J., Hirsch-Reinshagen, V., Bloks, V. W., Bakker, A. H., Ramaekers, F. C., de Vente, J., Groen, A. K., Wellington, C. L., Kuipers, F. and Mulder, M. (2006) 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* **281**, 12799-808.
- Akerstrom, B., Flower, D. R. and Salier, J. P. (2000) Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 1-8.
- Albrecht, E. D. and Pepe, G. J. (1990) Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev* **11**, 124-50.
- Anderson, R. G. (2003) Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. *Trends Cell Biol* **13**, 534-9.
- Apostolopoulos, J. J., Howlett, G. J. and Fidge, N. (1987) Effects of dietary cholesterol and hypothyroidism on rat apolipoprotein mRNA metabolism. *J Lipid Res* **28**, 642-8.
- Arakawa, R. and Yokoyama, S. (2002) Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J Biol Chem* **277**, 22426-9.
- Ayrault-Jarrier, M., Levy, G. and Polonovski, J. (1963) [Study of Humanserum Alpha-Lipoproteins by Immunoelectrophoresis.]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* **45**, 703-13.
- Battaglia, F. C. and Meschia, G. (1988) Fetal nutrition. *Annu Rev Nutr* **8**, 43-61.
- Baumann, M. U., Deborde, S. and Illsley, N. P. (2002) Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* **19**, 13-22.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. and Stanley, K. K. (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* **341**, 162-4.

- Belalcazar, L. M., Merched, A., Carr, B., Oka, K., Chen, K. H., Pastore, L., Beaudet, A. and Chan, L. (2003) Long-term stable expression of human apolipoprotein A-I mediated by helper-dependent adenovirus gene transfer inhibits atherosclerosis progression and remodels atherosclerotic plaques in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *Circulation* **107**, 2726-32.
- Belkacemi, L., Gariépy, G., Mounier, C., Simoneau, L. and Lafond, J. (2004) Calbindin-D9k (CaBP9k) localization and levels of expression in trophoblast cells from human term placenta. *Cell Tissue Res* **315**, 107-17.
- Benoist, F. and Grand-Perret, T. (1997) Co-translational degradation of apolipoprotein B100 by the proteasome is prevented by microsomal triglyceride transfer protein. Synchronized translation studies on HepG2 cells treated with an inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* **272**, 20435-42.
- Benvenga, S., Cahnmann, H. J. and Robbins, J. (1993) Characterization of thyroid hormone binding to apolipoprotein-E: localization of the binding site in the exon 3-coded domain. *Endocrinology* **133**, 1300-5.
- Berliner, J. A., Territo, M. C., Sevanian, A., Ramin, S., Kim, J. A., Bamshad, B., Esterson, M. and Fogelman, A. M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* **85**, 1260-6.
- Blanco-Vaca, F., Escola-Gil, J. C., Martin-Campos, J. M. and Julve, J. (2001) Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein. *J Lipid Res* **42**, 1727-39.
- Bobryshev, Y. V. (2006) Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* **37**, 208-22.
- Boyles, J. K., Notterpek, L. M., Wardell, M. R. and Rall, S. C., Jr. (1990) Identification, characterization, and tissue distribution of apolipoprotein D in the rat. *J Lipid Res* **31**, 2243-56.
- Braunwald, E. (1997) Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* **337**, 1360-9.

- Brewer, H. B., Jr., Fairwell, T., LaRue, A., Ronan, R., Houser, A. and Bronzert, T. J. (1978) The amino acid sequence of human APOA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* **80**, 623-30.
- Broring, K., Haest, C. W. and Deuticke, B. (1989) Translocation of oleic acid across the erythrocyte membrane. Evidence for a fast process. *Biochim Biophys Acta* **986**, 321-31.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1976) Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* **191**, 150-4.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 11041-8.
- Bruns, G. A., Karathanasis, S. K. and Breslow, J. L. (1984) Human apolipoprotein A-I--C-III gene complex is located on chromosome 11. *Arteriosclerosis* **4**, 97-102.
- Carmena, M. J., Hueso, C., Guijarro, L. G. and Prieto, J. C. (1991) Cholesterol modulation of membrane fluidity and VIP receptor/effector system in rat prostatic epithelial cells. *Regul Pept* **33**, 287-97.
- Carozzi, A. J., Ikonen, E., Lindsay, M. R. and Parton, R. G. (2000) Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis. *Traffic* **1**, 326-41.
- Chastang, N., Hartemann-Heurtier, A., Sachon, C., Vauthier, D., Darbois, Y., Bissery, A., Golmard, J. L. and Grimaldi, A. (2003) Comparison of two diagnostic tests for gestational diabetes in predicting macrosomia. *Diabetes Metab* **29**, 139-44.
- Christensen, H. N. (1984) Naming plan for membrane transport systems for amino acids. *Neurochem Res* **9**, 1757-8.
- Christensen, H. N. and Handlogten, M. E. (1979) Interaction between parallel transport systems examined with tryptophan and related amino acids. *J Neural Transm Suppl*, 1-13.

- Christensen, H. N. and Liang, M. (1966) On the nature of the "non-saturable" migration of amino acids into Ehrlich cells and into rat jejunum. *Bibl Laeger* **112**, 524-31.
- Cladaras, C., Hadzopoulou-Cladaras, M., Nolte, R. T., Atkinson, D. and Zannis, V. I. (1986) The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *Embo J* **5**, 3495-507.
- Claude, A. (1970) Growth and differentiation of cytoplasmic membranes in the course of lipoprotein granule synthesis in the hepatic cell. I. Elaboration of elements of the Golgi complex. *J Cell Biol* **47**, 745-66.
- Courtois, M., Khatami, S., Fantini, E., Athias, P., Mielle, P. and Grynberg, A. (1992) Polyunsaturated fatty acids in cultured cardiomyocytes: effect on physiology and beta-adrenoceptor function. *Am J Physiol* **262**, H451-6.
- Dang, Q. and Taylor, J. (1996) In vivo footprinting analysis of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene locus. *J Biol Chem* **271**, 28667-76.
- Dang, Q., Walker, D., Taylor, S., Allan, C., Chin, P., Fan, J. and Taylor, J. (1995) Structure of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/C-I gene locus. *J Biol Chem* **270**, 22577-85.
- Davidson, N. O., Carlos, R. C. and Lukaszewicz, A. M. (1990) Apolipoprotein B mRNA editing is modulated by thyroid hormone analogs but not growth hormone administration in the rat. *Mol Endocrinol* **4**, 779-85.
- Davidson, N. O., Powell, L. M., Wallis, S. C. and Scott, J. (1988) Thyroid hormone modulates the introduction of a stop codon in rat liver apolipoprotein B messenger RNA. *J Biol Chem* **263**, 13482-5.
- Davidson, N. O. and Shelness, G. S. (2000) APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr* **20**, 169-93.
- Davison, P. J., Norton, P., Wallis, S. C., Gill, L., Cook, M., Williamson, R. and Humphries, S. E. (1986) There are two gene sequences for human apolipoprotein CI (apo CI) on chromosome 19, one of which is 4 kb from the gene for apo E. *Biochem Biophys Res Commun* **136**, 876-84.

- de la Llera-Moya, M., Rothblat, G. H., Connelly, M. A., Kellner-Weibel, G., Sakr, S. W., Phillips, M. C. and Williams, D. L. (1999) Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J Lipid Res* **40**, 575-80.
- Dhingra, S. and Bansal, M. P. (2005) Hypercholesterolemia and apolipoprotein B expression: regulation by selenium status. *Lipids Health Dis* **4**, 28.
- Doerner, K. C., Gurley, E. C., Vlahcevic, Z. R. and Hylemon, P. B. (1995) Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase expression by sterols in primary rat hepatocyte cultures. *J Lipid Res* **36**, 1168-77.
- Drayna, D., Fielding, C., McLean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Rhee, L. and et al. (1986) Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J Biol Chem* **261**, 16535-9.
- Drayna, D. T., McLean, J. W., Wion, K. L., Trent, J. M., Drabkin, H. A. and Lawn, R. M. (1987) Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha 2u-globulin superfamily. *DNA* **6**, 199-204.
- Du, E. Z., Fleming, J. F., Wang, S. L., Spitsen, G. M. and Davis, R. A. (1999) Translocation-arrested apolipoprotein B evades proteasome degradation via a sterol-sensitive block in ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* **274**, 1856-62.
- Duchateau, P. N., Movsesyan, I., Yamashita, S., Sakai, N., Hirano, K., Schoenhaus, S. A., O'Connor-Kearns, P. M., Spencer, S. J., Jaffe, R. B., Redberg, R. F., Ishida, B. Y., Matsuzawa, Y., Kane, J. P. and Malloy, M. J. (2000) Plasma apolipoprotein L concentrations correlate with plasma triglycerides and cholesterol levels in normolipidemic, hyperlipidemic, and diabetic subjects. *J Lipid Res* **41**, 1231-6.
- Duchateau, P. N., Pullinger, C. R., Cho, M. H., Eng, C. and Kane, J. P. (2001) Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J Lipid Res* **42**, 620-30.
- Duchateau, P. N., Pullinger, C. R., Orellana, R. E., Kunitake, S. T., Naya-Vigne, J., O'Connor, P. M., Malloy, M. J. and Kane, J. P. (1997) Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *J Biol Chem* **272**, 25576-82.

- Durbin, D. M. and Jonas, A. (1999) Lipid-free apolipoproteins A-I and A-II promote remodeling of reconstituted high density lipoproteins and alter their reactivity with lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* **40**, 2293-302.
- Eaton, B. M. and Yudilevich, D. L. (1981) Uptake and asymmetric efflux of amino acids at maternal and fetal sides of placenta. *Am J Physiol* **241**, C106-12.
- Elshourbagy, N. A., Boguski, M. S., Liao, W. S., Jefferson, L. S., Gordon, J. I. and Taylor, J. M. (1985a) Expression of rat apolipoprotein A-IV and A-I genes: mRNA induction during development and in response to glucocorticoids and insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8242-6.
- Elshourbagy, N. A., Liao, W. S., Mahley, R. W. and Taylor, J. M. (1985b) Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 203-7.
- Enders, R. H., Judd, R. M., Donohue, T. M. and Smith, C. H. (1976) Placental amino acid uptake. III. Transport systems for neutral amino acids. *Am J Physiol* **230**, 706-10.
- Farese, R. V., Jr. and Herz, J. (1998) Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends Genet* **14**, 115-20.
- Fielding, C. J. and Fielding, P. E. (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* **36**, 211-28.
- Fisher, C. A., Narayanaswami, V. and Ryan, R. O. (2000) The lipid-associated conformation of the low density lipoprotein receptor binding domain of human apolipoprotein E. *J Biol Chem* **275**, 33601-6.
- Fisher, E. A., Zhou, M., Mitchell, D. M., Wu, X., Omura, S., Wang, H., Goldberg, A. L. and Ginsberg, H. N. (1997) The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70. *J Biol Chem* **272**, 20427-34.
- Fox, H., Elston, C. W. and Bennington, J. L. (1978) Major problems in pathology. In *Major problems in pathology, Vol. VII*, pp. Chapter I, 1-37, Saunders, Vol.7 : Pathology of the placenta, Chapter I, 1-37, Philadelphia.

- Furuhashi, M., Seo, H., Mizutani, S., Narita, O., Tomoda, Y. and Matsui, N. (1989) Expression of low density lipoprotein receptor gene in human placenta during pregnancy. *Mol Endocrinol* **3**, 1252-6.
- Garnica, A. D. and Chan, W. Y. (1996) The role of the placenta in fetal nutrition and growth. *J Am Coll Nutr* **15**, 206-22.
- Glaumann, H., Bergstrand, A. and Ericsson, J. L. (1975) Studies on the synthesis and intracellular transport of lipoprotein particles in rat liver. *J Cell Biol* **64**, 356-77.
- Gluckman, P. D. and Pinal, C. S. (2002) Maternal-placental-fetal interactions in the endocrine regulation of fetal growth: role of somatotrophic axes. *Endocrine* **19**, 81-9.
- Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425-30.
- Guibourdenche, J., Alsat, E., Soncin, F., Rochette-Egly, C. and Evain-Brion, D. (1998) Retinoid receptors expression in human term placenta: involvement of RXR alpha in retinoid induced-hCG secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 1384-7.
- Guyard-Dangremont, V., Lagrost, L. and Gamber, P. (1994) Comparative effects of purified apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV on cholesteryl ester transfer protein activity. *J Lipid Res* **35**, 982-92.
- Hampton, R., Dimster-Denk, D. and Rine, J. (1996) The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation. *Trends Biochem Sci* **21**, 140-5.
- Harris, F. M., Tesseur, I., Brecht, W. J., Xu, Q., Mullendorff, K., Chang, S., Wyss-Coray, T., Mahley, R. W. and Huang, Y. (2004) Astroglial regulation of apolipoprotein E expression in neuronal cells. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **279**, 3862-8.
- Hay, W. W., Jr. (1994) Placental transport of nutrients to the fetus. *Horm Res* **42**, 215-22.
- Herrera, E. (2002) Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* **19**, 43-55.

- Herrera, E., Lasuncion, M. A., Gomez-Coronado, D., Aranda, P., Lopez-Luna, P. and Maier, I. (1988) Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **158**, 1575-83.
- Herz, J. and Bock, H. H. (2002) Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem* **71**, 405-34.
- Hoeg, J. M., Feuerstein, I. M. and Tucker, E. E. (1994) Detection and quantitation of calcific atherosclerosis by ultrafast computed tomography in children and young adults with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* **14**, 1066-74.
- Ibdah, J. A., Krebs, K. E. and Phillips, M. C. (1989) The surface properties of apolipoproteins A-I and A-II at the lipid/water interface. *Biochim Biophys Acta* **1004**, 300-8.
- Illsley, N. P., Hall, S., Penfold, P. and Stacey, T. E. (1985) Diffusional permeability of the human placenta. *Contrib Gynecol Obstet* **13**, 92-7.
- Ishigami, M., Swertfeger, D. K., Granholm, N. A. and Hui, D. Y. (1998) Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *J Biol Chem* **273**, 20156-61.
- Jackson, R. L., Morrisett, J. D. and Gotto, A. M., Jr. (1976) Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol Rev* **56**, 259-316.
- Jaffe, R. B. and Peterson, E. P. (1966) In vivo steroid biogenesis and metabolism in the human term placenta. 2. In situ placental perfusion with cholesterol-7- α -³H. *Steroids* **8**, 695-710.
- Jansson, T., Powell, T. L. and Illsley, N. P. (1993) Non-electrolyte solute permeabilities of human placental microvillous and basal membranes. *J Physiol* **468**, 261-74.
- Johnson, J. W., Longmate, J. A. and Frentzen, B. (1992) Excessive maternal weight and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* **167**, 353-70; discussion 370-2.

- Johnson, W. J., Mahlberg, F. H., Rothblat, G. H. and Phillips, M. C. (1991) Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1085**, 273-98.
- Jonas, A. (2000) Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 245-56.
- Jong, M. C., Hofker, M. H. and Havekes, L. M. (1999) Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 472-84.
- Joost, H. G. and Thorens, B. (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* **18**, 247-56.
- Kalin, M. F. and Zumoff, B. (1990) Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* **55**, 330-52.
- Kane, J. P. (1983) Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annu Rev Physiol* **45**, 637-50.
- Kane, J. P., Hardman, D. A. and Paulus, H. E. (1980) Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2465-9.
- Karathanasis, S. K. (1985) Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII, and AIV genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6374-8.
- Kardassis, D., Tzamelis, I., Hadzopoulou-Cladaras, M., Talianidis, I. and Zannis, V. (1997) Distal apolipoprotein C-III regulatory elements F to J act as a general modular enhancer for proximal promoters that contain hormone response elements. Synergism between hepatic nuclear factor-4 molecules bound to the proximal promoter and distal enhancer sites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 222-32.
- Kayden, H. J. (1972) Abetalipoproteinemia. *Annu Rev Med* **23**, 285-96.

- Keryer, G., Alsat, E., Tasken, K. and Evain-Brion, D. (1998) Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *J Cell Sci* **111** (Pt 7), 995-1004.
- King, J. C., Butte, N. F., Bronstein, M. N., Kopp, L. E. and Lindquist, S. A. (1994) Energy metabolism during pregnancy: influence of maternal energy status. *Am J Clin Nutr* **59**, 439S-445S.
- Knipp, G. T., Audus, K. L. and Soares, M. J. (1999) Nutrient transport across the placenta. *Adv Drug Deliv Rev* **38**, 41-58.
- Knopp, R. H., Boroush, M. A. and O'Sullivan, J. B. (1975) Lipid metabolism in pregnancy. II. Postheparin lipolytic activity and hypertriglyceridemia in the pregnant rat. *Metabolism* **24**, 481-93.
- Kutteh, W. H., Rainey, W. E. and Carr, B. R. (1994) Regulatory effects of multifunctional cytokines and steroid hormones on apolipoprotein B production by human fetal hepatocytes. *J Soc Gynecol Investig* **1**, 256-63.
- Ladas, J. A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V. and Cladaras, C. (1992) Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J Biol Chem* **267**, 15849-60.
- Laffitte, B. A., Repa, J. J., Joseph, S. B., Wilpitz, D. C., Kast, H. R., Mangelsdorf, D. J. and Tontonoz, P. (2001) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 507-12.
- Lafond, J., Leclerc, M. and Brunette, M. G. (1991) Characterization of calcium transport by basal plasma membranes from human placental syncytiotrophoblast. *J Cell Physiol* **148**, 17-23.
- Lakka, T. A., Lakka, H. M., Salonen, R., Kaplan, G. A. and Salonen, J. T. (2001) Abdominal obesity is associated with accelerated progression of carotid atherosclerosis in men. *Atherosclerosis* **154**, 497-504.
- Lambert, J., Provost, P. R., Marcel, Y. L. and Rassart, E. (1993) Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochim Biophys Acta* **1172**, 190-2.

- Law, S. W., Lackner, K. J., Hospattankar, A. V., Anchors, J. M., Sakaguchi, A. Y., Naylor, S. L. and Brewer, H. B., Jr. (1985) Human apolipoprotein B-100: cloning, analysis of liver mRNA, and assignment of the gene to chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8340-4.
- Lawn, R. M., Wade, D. P., Garvin, M. R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J. G., Seilhamer, J. J., Vaughan, A. M. and Oram, J. F. (1999) The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* **104**, R25-31.
- Lee, H., Park, H., Kim, Y. J., Kim, H. J., Ahn, Y. M., Park, B., Park, J. H. and Lee, B. E. (2005) Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in human preeclamptic placenta: possible implications in the process of trophoblast apoptosis. *Placenta* **26**, 226-33.
- Lehtimäki, T., Dastidar, P., Jokela, H., Koivula, T., Lehtinen, S., Ehnholm, C. and Punnonen, R. (2002) Effect of long-term hormone replacement therapy on atherosclerosis progression in postmenopausal women relates to functional apolipoprotein e genotype. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4147-53.
- Li, T., Kong, X., Owsley, E., Ellis, E., Strom, S. and Chiang, J. Y. (2006) Insulin regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase expression in human hepatocytes: Roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element binding protein 1c. *J Biol Chem*.
- Li, W. H., Tanimura, M., Luo, C. C., Datta, S. and Chan, L. (1988) The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res* **29**, 245-71.
- Lin, R. C. (1988) Effects of hormones on apolipoprotein secretion in cultured rat hepatocytes. *Metabolism* **37**, 745-51.
- Linden, D., Sjöberg, A., Asp, L., Carlsson, L. and Oscarsson, J. (2000) Direct effects of growth hormone on production and secretion of apolipoprotein B from rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E1335-46.
- Liu, J., Chang, C. C., Westover, E. J., Covey, D. F. and Chang, T. Y. (2005) Investigating the allostereism of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) by using various sterols: in vitro and intact cell studies. *Biochem J* **391**, 389-97.

- Lorentz, A., Plonne, D., Schulze, H. P. and Dargel, R. (1996) Dexamethasone enhanced by insulin, but not by thyroid hormones stimulates apolipoprotein B mRNA editing in cultured rat hepatocytes depending on the developmental stage. *FEBS Lett* **391**, 57-60.
- Lund-Katz, S., Murley, Y. M., Yon, E., Gillotte, K. L. and Davidson, W. S. (1996) Comparison of the structural and functional effects of monomeric and dimeric human apolipoprotein A-II in high density lipoprotein particles. *Lipids* **31**, 1107-13.
- Madsen, E. M., Lindegaard, M. L., Andersen, C. B., Damm, P. and Nielsen, L. B. (2004) Human placenta secretes apolipoprotein B-100-containing lipoproteins. *J Biol Chem* **279**, 55271-6.
- Magoori, K., Kang, M. J., Ito, M. R., Kakuuchi, H., Ioka, R. X., Kamataki, A., Kim, D. H., Asaba, H., Iwasaki, S., Takei, Y. A., Sasaki, M., Usui, S., Okazaki, M., Takahashi, S., Ono, M., Nose, M., Sakai, J., Fujino, T. and Yamamoto, T. T. (2003) Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E. *J Biol Chem* **278**, 11331-6.
- Mahley, R. W. (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**, 622-30.
- Mazzone, T. and Basheeruddin, K. (1991) Dissociated regulation of macrophage LDL receptor and apolipoprotein E gene expression by sterol. *J Lipid Res* **32**, 507-14.
- Mazzone, T., Basheeruddin, K. and Poulos, C. (1989) Regulation of macrophage apolipoprotein E gene expression by cholesterol. *J Lipid Res* **30**, 1055-64.
- McConathy, W. J. and Alaupovic, P. (1976) Studies on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma. *Biochemistry* **15**, 515-20.
- McConihay, J. A., Horn, P. S. and Woollett, L. A. (2001) Effect of maternal hypercholesterolemia on fetal sterol metabolism in the Golden Syrian hamster. *J Lipid Res* **42**, 1111-9.

- McGladdery, S. H. and Frohlich, J. J. (2001) Lipoprotein lipase and apoE polymorphisms: relationship to hypertriglyceridemia during pregnancy. *J Lipid Res* **42**, 1905-12.
- McManus, D. C., Scott, B. R., Frank, P. G., Franklin, V., Schultz, J. R. and Marcel, Y. L. (2000) Distinct central amphipathic alpha-helices in apolipoprotein A-I contribute to the in vivo maturation of high density lipoprotein by either activating lecithin-cholesterol acyltransferase or binding lipids. *J Biol Chem* **275**, 5043-51.
- Mehta, J. L., Chen, J., Hermonat, P. L., Romeo, F. and Novelli, G. (2006) Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res* **69**, 36-45.
- Miyata, M. and Smith, J. D. (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* **14**, 55-61.
- Montoudis, A., Boileau, S., Simoneau, L. and Lafond, J. (2003) Impact of an enriched-cholesterol diet on enzymatic cholesterol metabolism during rabbit gestation. *Life Sci* **73**, 1463-77.
- Moreau, R., Daoud, G., Bernatchez, R., Simoneau, L., Masse, A. and Lafond, J. (2002) Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta. *Biochim Biophys Acta* **1564**, 325-32.
- Moreau, R., Daoud, G., Masse, A., Simoneau, L. and Lafond, J. (2003) Expression and role of calcium-ATPase pump and sodium-calcium exchanger in differentiated trophoblasts from human term placenta. *Mol Reprod Dev* **65**, 283-8.
- Mukhopadhyay, D., Plateroti, M., Anant, S., Nassir, F., Samarut, J. and Davidson, N. O. (2003) Thyroid hormone regulates hepatic triglyceride mobilization and apolipoprotein B messenger ribonucleic Acid editing in a murine model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* **144**, 711-9.
- Murao, K., Wada, Y., Nakamura, T., Taylor, A. H., Mooradian, A. D. and Wong, N. C. (1998) Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A-I gene expression. *J Biol Chem* **273**, 18959-65.

- Nagasaka, H., Chiba, H., Kikuta, H., Akita, H., Takahashi, Y., Yanai, H., Hui, S. P., Fuda, H., Fujiwara, H. and Kobayashi, K. (2002) Unique character and metabolism of high density lipoprotein (HDL) in fetus. *Atherosclerosis* **161**, 215-23.
- Napoli, C., D'Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G. and Palinski, W. (1997) Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **100**, 2680-90.
- Negis, Y., Aytan, N., Ozer, N., Ogru, E., Libinaki, R., Gianello, R., Azzi, A. and Zingg, J. M. (2006) The effect of tocopheryl phosphates on atherosclerosis progression in rabbits fed with a high cholesterol diet. *Arch Biochem Biophys* **450**, 63-6.
- Olofsson, S. O. and Boren, J. (2005) Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med* **258**, 395-410.
- Olofsson, S. O., Bostrom, K., Carlsson, P., Boren, J., Wettsten, M., Bjursell, G., Wiklund, O. and Bondjers, G. (1987) Structure and biosynthesis of apolipoprotein B. *Am Heart J* **113**, 446-52.
- Ordovas, J. M., Cassidy, D. K., Civeira, F., Bisgaier, C. L. and Schaefer, E. J. (1989) Familial apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. *J Biol Chem* **264**, 16339-42.
- Oscarsson, J., Carlsson, L. M., Bick, T., Lidell, A., Olofsson, S. O. and Eden, S. (1991) Evidence for the role of the secretory pattern of growth hormone in the regulation of serum concentrations of cholesterol and apolipoprotein E in rats. *J Endocrinol* **128**, 433-8.
- Ou, J., Ou, Z., Jones, D. W., Holzhauer, S., Hatoum, O. A., Ackerman, A. W., Weihrauch, D. W., Gutterman, D. D., Guice, K., Oldham, K. T., Hillery, C. A. and Pritchard, K. A., Jr. (2003) L-4F, an apolipoprotein A-I mimetic, dramatically improves vasodilation in hypercholesterolemia and sickle cell disease. *Circulation* **107**, 2337-41.
- Overbergh, L., Lorent, K., Torrekens, S., Van Leuven, F. and Van den Berghe, H. (1995) Expression of mouse alpha-macroglobulins, lipoprotein receptor-related protein,

- LDL receptor, apolipoprotein E, and lipoprotein lipase in pregnancy. *J Lipid Res* **36**, 1774-86.
- Palacin, M., Lasuncion, M. A., Asuncion, M. and Herrera, E. (1991) Circulating metabolite utilization by periuterine adipose tissue in situ in the pregnant rat. *Metabolism* **40**, 534-9.
- Palinski, W., D'Armiento, F. P., Witztum, J. L., de Nigris, F., Casanada, F., Condorelli, M., Silvestre, M. and Napoli, C. (2001) Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. *Circ Res* **89**, 991-6.
- Palinski, W. and Napoli, C. (2002) The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *Faseb J* **16**, 1348-60.
- Panagiotopoulos, S. E., Witting, S. R., Horace, E. M., Hui, D. Y., Maiorano, J. N. and Davidson, W. S. (2002) The role of apolipoprotein A-I helix 10 in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux via the ATP-binding cassette transporter ABCA1. *J Biol Chem* **277**, 39477-84.
- Papazafiri, P., Ogami, K., Ramji, D. P., Nicosia, A., Monaci, P., Cladaras, C. and Zannis, V. I. (1991) Promoter elements and factors involved in hepatic transcription of the human ApoA-I gene positive and negative regulators bind to overlapping sites. *J Biol Chem* **266**, 5790-7.
- Patel, R. C., Lange, D., McConathy, W. J., Patel, Y. C. and Patel, S. C. (1997) Probing the structure of the ligand binding cavity of lipocalins by fluorescence spectroscopy. *Protein Eng* **10**, 621-5.
- Paulweber, B., Sandhofer, F. and Levy-Wilson, B. (1993) The mechanism by which the human apolipoprotein B gene reducer operates involves blocking of transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor 3. *Mol Cell Biol* **13**, 1534-46.
- Peitsch, M. C. and Boguski, M. S. (1990) Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol* **2**, 197-206.

- Pepe, G. J. and Albrecht, E. D. (1995) Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev* **16**, 608-48.
- Phillips, M. C., Johnson, W. J. and Rothblat, G. H. (1987) Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim Biophys Acta* **906**, 223-76.
- Pitkin, R. M. (1983) Endocrine regulation of calcium homeostasis during pregnancy. *Clin Perinatol* **10**, 575-92.
- Poirier, J. (2005) Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **26**, 355-61.
- Pontoglio, M. (2000) Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J Am Soc Nephrol* **11 Suppl 16**, S140-3.
- Porter, D. G., Heap, R. B. and Flint, A. P. (1982) Endocrinology of the placenta and the evolution of viviparity. *J Reprod Fertil Suppl* **31**, 113-38.
- Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J. and Scott, J. (1987) A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* **50**, 831-40.
- Provost, P. R., Villeneuve, L., Weech, P. K., Milne, R. W., Marcel, Y. L. and Rassart, E. (1991) Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization. *J Lipid Res* **32**, 1959-70.
- Raabe, M., Flynn, L. M., Zlot, C. H., Wong, J. S., Veniant, M. M., Hamilton, R. L. and Young, S. G. (1998) Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8686-91.
- Radunovic, N., Kuczynski, E., Rosen, T., Dukanac, J., Petkovic, S. and Lockwood, C. J. (2000) Plasma apolipoprotein A-I and B concentrations in growth-retarded fetuses: a link between low birth weight and adult atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 85-8.

- Rall, S. C., Jr., Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. and Mahley, R. W. (1982) Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 4696-700.
- Ramos, P. and Herrera, E. (1995) Reversion of insulin resistance in the rat during late pregnancy by 72-h glucose infusion. *Am J Physiol* **269**, E858-63.
- Regnault, T. R., de Vrijer, B. and Battaglia, F. C. (2002) Transport and metabolism of amino acids in placenta. *Endocrine* **19**, 23-41.
- Richardson, B., Palgunachari, M. N., Anantharamaiah, G. M., Richards, R. G., Azrolan, N., Wiginton, D. and Handwerger, S. (1996) Human placental tissue expresses a novel 22.7 kDa apolipoprotein A-I-like protein. *Biochemistry* **35**, 7580-5.
- Rigotti, A., Acton, S. L. and Krieger, M. (1995) The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* **270**, 16221-4.
- Rindler, M. J., Traber, M. G., Esterman, A. L., Bersinger, N. A. and Dancis, J. (1991) Synthesis and secretion of apolipoprotein E by human placenta and choriocarcinoma cell lines. *Placenta* **12**, 615-24.
- Rodda, C. P., Kubota, M., Heath, J. A., Ebeling, P. R., Moseley, J. M., Care, A. D., Caple, I. W. and Martin, T. J. (1988) Evidence for a novel parathyroid hormone-related protein in fetal lamb parathyroid glands and sheep placenta: comparisons with a similar protein implicated in humoral hypercalcaemia of malignancy. *J Endocrinol* **117**, 261-71.
- Rose, H., Hennecke, T. and Kammermeier, H. (1990) Sarcolemmal fatty acid transfer in isolated cardiomyocytes governed by albumin/membrane-lipid partition. *J Mol Cell Cardiol* **22**, 883-92.
- Rose, H. G. and Juliano, J. (1977) Regulation of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase. II. Activation during alimentary lipemia. *J Lab Clin Med* **89**, 525-32.
- Rosenblat, M., Volkova, N., Coleman, R. and Aviram, M. (2006) Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem* **54**, 1928-35.

- Ryan, K. J. and Smith, O. W. (1961) Biogenesis of estrogens by the human ovary. III. Conversion of cholesterol-4-C14 to estrone. *J Biol Chem* **236**, 2204-6.
- Sakata, N., Phillips, T. E. and Dixon, J. L. (2001) Distribution, transport, and degradation of apolipoprotein B-100 in HepG2 cells. *J Lipid Res* **42**, 1947-58.
- Salah, D., Bohnet, K., Gueguen, R., Siest, G. and Visvikis, S. (1997) Combined effects of lipoprotein lipase and apolipoprotein E polymorphisms on lipid and lipoprotein levels in the Stanislas cohort. *J Lipid Res* **38**, 904-12.
- Sanchez, D., Ganfornina, M. D. and Martinez, S. (2002) Expression pattern of the lipocalin apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mech Dev* **110**, 225-9.
- Santillo, M., Migliaro, A., Mondola, P., Laezza, C., Damiano, S., Stingo, S., Fiorentino, L., Andreozzi, A., Vitale, M. and Bifulco, M. (1999) Dietary and hypothyroid hypercholesterolemia induces hepatic apolipoprotein E expression in the rat: direct role of cholesterol. *FEBS Lett* **463**, 83-6.
- Schlegel, A. and Lisanti, M. P. (2001) The caveolin triad: caveolae biogenesis, cholesterol trafficking, and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 41-51.
- Schmid, K. E., Davidson, W. S., Myatt, L. and Woollett, L. A. (2003) Transport of cholesterol across a BeWo cell monolayer: implications for net transport of sterol from maternal to fetal circulation. *J Lipid Res* **44**, 1909-18.
- Schrem, H., Klempnauer, J. and Borlak, J. (2002) Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol Rev* **54**, 129-58.
- Scollan-Koliopoulos, M., Guadagno, S. and Walker, E. A. (2006) Gestational diabetes management: guidelines to a healthy pregnancy. *Nurse Pract* **31**, 14-23; quiz 24-5.
- Seguin, D., Desforges, M. and Rassart, E. (1995) Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Brain Res Mol Brain Res* **30**, 242-50.

- Shi, Q. J., Lei, Z. M., Rao, C. V. and Lin, J. (1993) Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* **132**, 1387-95.
- Simonet, W. S., Bucay, N., Pitas, R. E., Lauer, S. J. and Taylor, J. M. (1991) Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J Biol Chem* **266**, 8651-4.
- Sladek, F. M. (1994) Orphan receptor HNF-4 and liver-specific gene expression. *Receptor* **4**, 64.
- Smit, M., van der Kooij-Meijjs, E., Frants, R. R., Havekes, L. and Klasen, E. C. (1988) Apolipoprotein gene cluster on chromosome 19. Definite localization of the APOC2 gene and the polymorphic Hpa I site associated with type III hyperlipoproteinemia. *Hum Genet* **78**, 90-3.
- Smith, J. D., Melian, A., Leff, T. and Breslow, J. L. (1988) Expression of the human apolipoprotein E gene is regulated by multiple positive and negative elements. *J Biol Chem* **263**, 8300-8.
- Smith, J. L., Lear, S. R., Forte, T. M., Ko, W., Massimi, M. and Erickson, S. K. (1998) Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat. *J Lipid Res* **39**, 2237-49.
- Smith, O. W. and Ryan, K. J. (1961) Biogenesis of estrogens by the human ovary: formation of neutral steroid intermediates from progesterone-4-C¹⁴, androstenedione-4-C¹⁴ and cholesterol-4-C¹⁴. *Endocrinology* **69**, 970-83.
- Spengel, F. A., Kaess, B., Keller, C., Kroner, K. K., Schreiber, M., Schuster, H. and Zollner, N. (1988) Atherosclerosis of the carotid arteries in young patients with familial hypercholesterolemia. *Klin Wochenschr* **66**, 65-8.
- Spreyer, P., Schaal, H., Kuhn, G., Rothe, T., Unterbeck, A., Olek, K. and Muller, H. W. (1990) Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *Embo J* **9**, 2479-84.
- Srisuparp, S., Strakova, Z. and Fazleabas, A. T. (2001) The role of chorionic gonadotropin (CG) in blastocyst implantation. *Arch Med Res* **32**, 627-34.

- Steel, R. B., Mosley, J. D. and Smith, C. H. (1979) Insulin and placenta: degradation and stabilization, binding to microvillous membrane receptors, and amino acid uptake. *Am J Obstet Gynecol* **135**, 522-9.
- Steyrer, E. and Kostner, G. M. (1988) Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I. *Biochim Biophys Acta* **958**, 484-91.
- Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D. and Roses, A. D. (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8098-102.
- Strobl, W., Gorder, N. L., Lin-Lee, Y. C., Gotto, A. M., Jr. and Patsch, W. (1990) Role of thyroid hormones in apolipoprotein A-I gene expression in rat liver. *J Clin Invest* **85**, 659-67.
- Struble, R. G., Nathan, B. P., Cady, C., Cheng, X. and McAsey, M. (2006) Estradiol regulation of astroglia and apolipoprotein E: An important role in neuronal regeneration. *Exp Gerontol*.
- Suckling, K. E. and Stange, E. F. (1985) Role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J Lipid Res* **26**, 647-71.
- Sviridov, D., Fidge, N., Beaumier-Gallon, G. and Fielding, C. (2001) Apolipoprotein A-I stimulates the transport of intracellular cholesterol to cell-surface cholesterol-rich domains (caveolae). *Biochem J* **358**, 79-86.
- Tailleux, A., Duriez, P., Fruchart, J. C. and Clavey, V. (2002) Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **164**, 1-13.
- Takahashi, K., Naito, M., Kodama, T., Suzuki, H., Mori, T. and Matsumoto, A. (1992) Expression of macrophage scavenger receptors in various human tissues and atherosclerotic lesions. *Clin Biochem* **25**, 365-8.
- Tarrade, A., Schoonjans, K., Guibourdenche, J., Bidart, J. M., Vidaud, M., Auwerx, J., Rochette-Egly, C. and Evain-Brion, D. (2001) PPAR gamma/RXR alpha

heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* **142**, 4504-14.

Taylor, A. H., Wishart, P., Lawless, D. E., Raymond, J. and Wong, N. C. (1996) Identification of functional positive and negative thyroid hormone-responsive elements in the rat apolipoprotein AI promoter. *Biochemistry* **35**, 8281-8.

Terrisse, L., Poirier, J., Bertrand, P., Merched, A., Visvikis, S., Siest, G., Milne, R. and Rassart, E. (1998) Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem* **71**, 1643-50.

Terrisse, L., Seguin, D., Bertrand, P., Poirier, J., Milne, R. and Rassart, E. (1999) Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E expression in rat hippocampus after entorhinal cortex lesion. *Brain Res Mol Brain Res* **70**, 26-35.

Theriault, A., Ogbonna, G. and Adeli, K. (1992) Thyroid hormone modulates apolipoprotein B gene expression in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 617-23.

Thomas, E. A., Laws, S. M., Sutcliffe, J. G., Harper, C., Dean, B., McClean, C., Masters, C., Lautenschlager, N., Gandy, S. E. and Martins, R. N. (2003) Apolipoprotein D levels are elevated in prefrontal cortex of subjects with Alzheimer's disease: no relation to apolipoprotein E expression or genotype. *Biol Psychiatry* **54**, 136-41.

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

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

Tsimikas, S. (2006) Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* **8**, 55-61.

Tsuda, M., Sanada, M., Nakagawa, H., Kodama, I., Sakashita, T. and Ohama, K. (2001) Phenotype of apolipoprotein E influences the lipid metabolic response of postmenopausal women to hormone replacement therapy. *Maturitas* **38**, 297-304.

- Tsukamoto, K., Tangirala, R. K., Chun, S., Usher, D., Pure, E. and Rader, D. J. (2000) Hepatic expression of apolipoprotein E inhibits progression of atherosclerosis without reducing cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. *Mol Ther* **1**, 189-94.
- Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B. G., Gerdes, L. U., Faergeman, O. and Humphries, S. E. (1993) Genetic markers in the apo AI-CIII-AIV gene cluster for combined hyperlipidemia, hypertriglyceridemia, and predisposition to atherosclerosis. *Atherosclerosis* **100**, 157-69.
- Tzamelis, I. and Zannis, V. I. (1996) Binding specificity and modulation of the ApoA-I promoter activity by homo- and heterodimers of nuclear receptors. *J Biol Chem* **271**, 8402-15.
- Utermann, G., Langenbeck, U., Beisiegel, U. and Weber, W. (1980) Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet* **32**, 339-47.
- van Cantfort, J. (1972) [Regulation of cholesterol-7 -hydroxylase by intrahepatic sterols in the rat]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **275**, 1015-7.
- Vandenbrouck, Y., Janvier, B., Lorient, C., Bereziat, G. and Mangeney-Andreani, M. (1995) Thyroid hormone modulates apolipoprotein-AI gene expression at the post-transcriptional level in Hep G2 cells. *Eur J Biochem* **231**, 126-32.
- Veerkamp, J. H., Peeters, R. A. and Maatman, R. G. (1991) Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1081**, 1-24.
- Vezina, C. A., Milne, R. W., Weech, P. K. and Marcel, Y. L. (1988) Apolipoprotein distribution in human lipoproteins separated by polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *J Lipid Res* **29**, 573-85.
- Villar, J., Cogswell, M., Kestler, E., Castillo, P., Menendez, R. and Repke, J. T. (1992) Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. *Am J Obstet Gynecol* **167**, 1344-52.
- Warden, C. H., Langner, C. A., Gordon, J. I., Taylor, B. A., McLean, J. W. and Lusis, A. J. (1989) Tissue-specific expression, developmental regulation, and chromosomal

mapping of the lecithin: cholesterol acyltransferase gene. Evidence for expression in brain and testes as well as liver. *J Biol Chem* **264**, 21573-81.

Weisgraber, K. H. (1994) Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* **45**, 249-302.

Wetterau, J. R., Aggerbeck, L. P., Bouma, M. E., Eisenberg, C., Munck, A., Hermier, M., Schmitz, J., Gay, G., Rader, D. J. and Gregg, R. E. (1992) Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* **258**, 999-1001.

Wetterau, J. R. and Zilversmit, D. B. (1986) Localization of intracellular triacylglycerol and cholesteryl ester transfer activity in rat tissues. *Biochim Biophys Acta* **875**, 610-7.

Witsch-Baumgartner, M., Gruber, M., Kraft, H. G., Rossi, M., Clayton, P., Giros, M., Haas, D., Kelley, R. I., Krajewska-Walasek, M. and Utermann, G. (2004) Maternal apo E genotype is a modifier of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* **41**, 577-84.

Wittmaack, F. M., Gafvels, M. E., Bronner, M., Matsuo, H., McCrae, K. R., Tomaszewski, J. E., Robinson, S. L., Strickland, D. K. and Strauss, J. F., 3rd. (1995) Localization and regulation of the human very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: trophoblast expression predicts a role for the receptor in placental lipid transport. *Endocrinology* **136**, 340-8.

Witztum, J. L. (1993) Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* **69**, S12-8.

Woollett, L. A. (1996) Origin of cholesterol in the fetal golden Syrian hamster: contribution of de novo sterol synthesis and maternal-derived lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res* **37**, 1246-57.

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

Wyne, K. L. and Woollett, L. A. (1998) Transport of maternal LDL and HDL to the fetal membranes and placenta of the Golden Syrian hamster is mediated by receptor-dependent and receptor-independent processes. *J Lipid Res* **39**, 518-30.

- Xu, P. T., Gilbert, J. R., Qiu, H. L., Ervin, J., Rothrock-Christian, T. R., Hulette, C. and Schmechel, D. E. (1999) Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am J Pathol* **154**, 601-11.
- Yao, Z., Tran, K. and McLeod, R. S. (1997) Intracellular degradation of newly synthesized apolipoprotein B. *J Lipid Res* **38**, 1937-53.
- Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M. R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* **75**, 187-97.
- Yokoyama, S. (2000) Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 231-44.
- Yu, H., Zhang, W., Yancey, P. G., Koury, M. J., Zhang, Y., Fazio, S. and Linton, M. F. (2006) Macrophage apolipoprotein E reduces atherosclerosis and prevents premature death in apolipoprotein E and scavenger receptor-class BI double-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 150-6.
- Zannis, V. I., Cole, F. S., Jackson, C. L., Kurnit, D. M. and Karathanasis, S. K. (1985) Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry* **24**, 4450-5.
- Zannis, V. I., Kardassis, D., Ogami, K., Hadzopoulou-Cladaras, M. and Cladaras, C. (1991) Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. *Adv Exp Med Biol* **285**, 1-23.
- Zech, L. A., Gross, E. G., Peck, G. L. and Brewer, H. B. (1983) Changes in plasma cholesterol and triglyceride levels after treatment with oral isotretinoin. A prospective study. *Arch Dermatol* **119**, 987-93.
- Zechner, R., Moser, R., Newman, T. C., Fried, S. K. and Breslow, J. L. (1991) Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. *J Biol Chem* **266**, 10583-8.

- Zhao, Y., Thorngate, F. E., Weisgraber, K. H., Williams, D. L. and Parks, J. S. (2005) Apolipoprotein E is the major physiological activator of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) on apolipoprotein B lipoproteins. *Biochemistry* **44**, 1013-25.
- Zhou, M., Fisher, E. A. and Ginsberg, H. N. (1998a) Regulated Co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100. A new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *J Biol Chem* **273**, 24649-53.
- Zhou, W. and Olsen, J. (1997) Gestational weight gain as a predictor of birth and placenta weight according to pre-pregnancy body mass index. *Acta Obstet Gynecol Scand* **76**, 300-7.
- Zhou, X., Paulsson, G., Stemme, S. and Hansson, G. K. (1998b) Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest* **101**, 1717-25.
- Zhu, Y. and Hui, D. Y. (2003) Apolipoprotein E binding to low density lipoprotein receptor-related protein-1 inhibits cell migration via activation of cAMP-dependent protein kinase A. *J Biol Chem* **278**, 36257-63.