

Université de Montréal

Régulation de l'apolipoprotéine C-I dans les cellules HepG2
et son rôle dans le métabolisme des lipides.

par

Catherine Bouchard

Département de médecine
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en sciences biomédicales

Août 2004

© Catherine Bouchard, 2004



W
4
U58
2005
V.097

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation de l'apolipoprotéine C-I dans les cellules HepG2
et son rôle dans le métabolisme des lipides.

présenté par :

Catherine Bouchard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Louise Brissette	président-rapporteur
Dr. Jeffrey S. Cohn	directeur de recherche
Dr. Benoît Lamarche	membre du jury

Résumé

L'apoC-I joue un rôle important dans le métabolisme des lipides plasmatiques. Cependant, la régulation de sa synthèse dans le foie demeure méconnue. L'objectif de ce travail était donc d'observer l'effet de différentes conditions de culture sur la production de l'apoC-I (et de l'apoE) par les cellules HepG2. Une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 a aussi été effectuée afin d'éclaircir le rôle de cette apolipoprotéine dans le métabolisme hépatique des lipides et des apolipoprotéines. Des expériences préliminaires ont démontré que la production de l'apoC-I est accrue lorsque des lipoprotéines du sérum humain sont ajoutées dans le milieu de culture des cellules HepG2. Les lipoprotéines riches en cholestérol (LDL et HDL) sont les plus aptes à augmenter le niveau de lipides cellulaires ainsi que la concentration d'apoC-I dans les cellules et le milieu. L'ajout de triglycérides sous forme d'Intralipid® dans le milieu a causé une augmentation des triglycérides cellulaires opposée à une diminution du cholestérol ainsi que du niveau d'apoC-I dans les cellules et le milieu. L'ajout d'un mélange de cholestérol et de 25-hydroxycholestérol au milieu a causé une augmentation du niveau de cholestérol cellulaire et d'apoC-I dans le milieu, alors que l'ajout de l'atorvastatine a causé une diminution du niveau de cholestérol cellulaire et d'apoC-I dans le milieu. Dans toutes les expériences, aucun changement significatif du niveau d'ARNm de l'apoC-I n'a été observé. Ces résultats suggèrent que la production de l'apoC-I dans le foie est dépendante du cholestérol cellulaire et est régulée de manière post-transcriptionnelle. Une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 a causé une augmentation du cholestérol et des triglycérides cellulaires ainsi que des apolipoprotéines associées aux lipoprotéines riches en triglycérides (apoB, apoC-III et apoE) et aux HDL (apoA-I) dans le milieu. Enfin, la surexpression de l'apoC-I augmente le niveau d'ARNm de l'apoE et du LDL-R mais diminue celui du VLDL-R. Ces résultats suggèrent que les lipides cellulaires ont un effet significatif sur la production hépatique de l'apoC-I et que l'apoC-I joue un rôle important dans le métabolisme hépatique des lipides.

Mots clés : Athérosclérose, cholestérol, triglycérides, lipoprotéines, apoE, foie.

Abstract

ApoC-I plays an important role in controlling plasma lipid metabolism. However little is known about factors regulating the hepatic synthesis and secretion of this apolipoprotein. In the present study, the effect of different tissue culture conditions was determined on the production of apoC-I (and apoE) by HepG2 cells. ApoC-I was also overexpressed in HepG2 cells, in order to understand its role in lipid and apolipoprotein metabolism. In initial experiments, it was found that cholesterol-rich lipoproteins (LDL and HDL) were capable of increasing cellular lipid levels as well as cellular and secreted levels of apoC-I. Triglyceride-rich lipoproteins (i.e., VLDL and IDL) appeared not to be responsible for the stimulatory effect of serum lipoproteins on apoC-I synthesis and secretion. Addition of Intralipid® triglyceride in the medium caused an increase in cellular triglyceride, a decrease in cellular cholesterol, and a decrease in levels of cellular and medium apoC-I. These results suggested that apoC-I production by HepG2 cells was dependent on levels of cellular cholesterol rather than those of cellular triglyceride. Experiments in which cells were loaded with cholesterol (incubation with 10 µg/ml cholesterol plus 1 µg/ml 25-hydroxycholesterol) or depleted of cholesterol (statin treatment) confirmed that apoC-I production was positively related to cellular cholesterol levels and not to cellular triglyceride levels. In all of these experiments, no significant changes were observed in cellular apoC-I mRNA levels, demonstrating the importance of post-transcriptional mechanisms in the regulation of apoC-I synthesis and secretion by HepG2 cells. Overexpression of apoC-I in HepG2 cells led to an increase in cellular cholesterol and triglyceride as well as apolipoproteins A-I, B, C-III and E in the medium. Furthermore, apoE and LDL-R mRNA were increased while VLDL-R mRNA was decreased. These results suggest that cellular lipids can have a significant effect on hepatic apoC-I production and apoC-I can in turn have a profound effect on hepatic lipid metabolism.

Key words: Atherosclerosis, cholesterol, triglycerides, lipoproteins, apoE, liver.

Table des Matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
I- Introduction.....	1
II- Revue de la littérature.....	5
1. Les lipoprotéines.....	5
1.1 Structure des lipoprotéines.....	5
1.2 Fonctions des apolipoprotéines.....	5
1.3 Métabolisme des chylomicrons.....	6
1.4 Métabolisme des lipoprotéines de très faible densité, des lipoprotéines de densité intermédiaire et des lipoprotéines de faible densité.....	8
1.5 Métabolisme des lipoprotéines de haute densité	9
2. L'apolipoprotéine C-I.....	11
2.1 Structure de l'apolipoprotéine C-I.....	11
2.2 Gène <i>APOC1</i>	12
2.3 Rôles biologiques de l'apolipoprotéine C-I.....	15
2.4 L'apolipoprotéine C-I chez l'humain.....	19

III- Régulation des niveaux de l'apolipoprotéine C-I dans les cellules hépatiques.....	22
1. Introduction.....	22
2. Matériel et méthodes.....	23
2.1 Culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains.....	23
2.2 Effet de l'ajout de lipoprotéines dans le milieu de culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains.....	23
2.3 Effet de l'ajout de triglycérides dans le milieu de culture des cellules HepG2.....	24
2.4 Effet de l'ajout de cholestérol dans le milieu de culture des cellules HepG2.....	25
2.5 Effet de l'ajout d'atorvastatine dans le milieu de culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains.....	25
2.6 Extraction et quantification des lipides cellulaires.....	25
2.7 Extraction et quantification des protéines.....	26
2.8 Extraction et quantification de l'ARN messager.....	27
2.9 Analyse statistique.....	27
3. Résultats.....	28
3.1 Effet de l'ajout de lipoprotéines dans le milieu de culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains.....	28
3.2 Effet de l'ajout de triglycérides dans le milieu de culture des cellules HepG2.....	33
3.3 Effet de l'ajout de cholestérol dans le milieu de culture des cellules HepG2.....	35
3.4 Effet de l'ajout d'atorvastatine dans le milieu de culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains.....	38
4. Discussion.....	41

IV- Effet d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2.....	47
1. Introduction.....	47
2. Matériel et méthodes.....	48
2.1 Construction du plasmide.....	48
2.2 Transfection des cellules HepG2.....	49
2.3 Extraction et quantification des lipides, des protéines et de l'ARN messenger.....	50
3. Résultats.....	51
4. Discussion.....	56
V- Discussion et conclusion.....	60
VI- Bibliographie.....	66
Appendice.....	xi
Remerciements.....	xii

Liste des tableaux

Tableau 1 – Caractéristiques des principales apolipoprotéines plasmatiques humaines.....	7
Tableau 2 – Effet de l'ajout de lipoprotéines humaines dans le milieu de culture des cellules HepG2.....	31
Tableau 3 – Effet de l'ajout de lipoprotéines bovines dans le milieu de culture des hépatocytes humains en culture primaire.....	32
Tableau 4 – Effet de l'ajout d'atorvastatine dans le milieu de culture des hépatocytes humains en culture primaire.....	40
Tableau 5 – Effet d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 sur les niveaux d'ARNm néo, apoC-I et apoE.....	52
Tableau 6 – Effet d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 sur la quantité de lipides, d'apoC-I et d'apoE cellulaires	53
Tableau 7 – Effet d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 sur la quantité des différentes apolipoprotéines présentes dans le milieu.....	54
Tableau 8 – Effet d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 sur les niveaux d'ARNm du LDL-R, de la LRP et du VLDL-R.....	55

Liste des figures

Figure 1 –	Structure de l'apoC-I.....	11
Figure 2 –	<i>Cluster</i> incluant le gène <i>APOC1</i>	12
Figure 3 –	Effet de l'ajout de lipoprotéines humaines dans le milieu de culture des cellules HepG2.....	29
Figure 4 –	Effet de l'ajout de triglycérides dans le milieu de culture des cellules HepG2.....	34
Figure 5 –	Effet de l'ajout d'un mélange de stérols dans le milieu de culture des cellules HepG2.....	36
Figure 6 –	Effet de l'ajout de 25-hydroxycholestérol dans le milieu de culture des cellules HepG2.....	37
Figure 7 –	Effet de l'ajout d'atorvastatine dans le milieu de culture des cellules HepG2.....	39

Liste des abréviations

ABCA1 :	<i>Adenosine triphosphate-binding cassette protein A1 (ABCA1)</i>
Apo :	Apolipoprotéine
ApoCs :	Apolipoprotéines C-I, C-II et C-III
ARNm :	ARN messenger
β -VLDL :	Résidu de VLDL
CHL :	Patients hyperlipidémiques combinés
CETP :	Protéine de transfert du cholestérol estérifié (<i>Cholesterol ester transfer protein</i>)
ELISA :	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FABP :	<i>Fatty acid binding protein</i>
FBS :	Sérum bovin foetal (<i>Fœtal bovine serum</i>)
FXR :	<i>Farnesoid X-activated receptor</i>
HCR :	Région de contrôle hépatique (<i>Hepatic control region</i>)
HDL :	Lipoprotéine de haute densité (<i>High-density lipoprotein</i>)
HL :	Lipase hépatique (<i>Hepatic lipase</i>)
HTG :	Patients hypertriglycéridémiques
IDL :	Lipoprotéine de densité intermédiaire (<i>Intermediate-density lipoprotein</i>)
LCAT :	Lécithine:cholestérol acyltransférase (<i>Lecithin:cholesterol acyltransferase</i>)
LDL :	Lipoprotéine de faible densité (<i>Low-density lipoprotein</i>)
LDL-R :	Récepteur de LDL (<i>Low-density lipoprotein receptor</i>)
LPDS :	Sérum déficient en lipoprotéines (<i>Lipoprotein-deficient serum</i>)
LPL :	Lipoprotéine lipase (<i>Lipoprotein lipase</i>)
LRP :	Protéine apparentée au récepteur de LDL (<i>LDL-receptor related protein</i>)
LXR :	<i>Liver X-activated receptor</i>
MCV :	Maladies cardio-vasculaires
ME :	<i>Multienhancer</i>

PBS :	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PPAR :	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RE :	Réticulum endoplasmique
RXR :	<i>Retinoic acid receptor</i>
SCAP :	<i>SREBP cleavage activating protein</i>
SD :	Écart-type (<i>Standard deviation</i>)
SR-BI :	<i>Scavenger receptor class B type 1</i>
SRE :	<i>Sterol regulatory element</i>
SREBP :	<i>Sterol regulatory element- binding protein</i>
TRL :	Lipoprotéine riche en triglycérides (<i>Triglyceride-rich lipoprotein</i>)
VLDL :	Lipoprotéine de très faible densité (<i>Very low-density lipoprotein</i>)
VLDL-R :	Récepteur de VLDL (<i>Very low-density lipoprotein receptor</i>)

I – Introduction

Les maladies cardio-vasculaires (MCV), incluant les coronaropathies, les maladies vasculaires cérébrales, et les maladies vasculaires périphériques, sont considérées comme la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés [1]. Elles sont généralement causées par l'athérosclérose, une pathologie caractérisée par le durcissement et le rétrécissement du calibre des artères coronariennes [2,3]. L'athérosclérose débute par une strie lipidique lorsque les lipoprotéines de faible densité (LDL) s'infiltrant sous l'endothélium où elles sont oxydées. La modification des LDL attire ensuite des monocytes sous l'endothélium et stimule leur différenciation en macrophages. Ces derniers internalisent les LDL oxydées et deviennent des cellules spumeuses remplies de cholestérol estérifié. Les macrophages spumeux s'accumulent dans la lésion ce qui entraîne l'épaississement de la paroi artérielle ainsi qu'une réponse inflammatoire. La rupture de l'endothélium expose les cellules musculaires lisses dans l'intima des artères qui produisent ensuite un excès de tissu conjonctif. Elles encapsulent progressivement les cellules spumeuses amassées sous l'endothélium pour former une chape fibreuse. Les plaques d'athéromes peuvent rester stables pendant plusieurs années, mais leur rupture induira l'apparition d'un thrombus artériel et d'une occlusion vasculaire, provoquant une MCV.

L'hypercholestérolémie, conséquence de l'hérédité ou de mauvaises habitudes de vie, est le principal facteur de risque des MCV [4]. Le cholestérol est un stéroïde insoluble dans l'eau et son transport dans le plasma est donc assuré par les lipoprotéines (voir chapitre II, section 1.1). Les LDL transportent le cholestérol vers les tissus extra-hépatiques où il est essentiel à la réparation et à la croissance cellulaire (voir chapitre II, section 1.4). Les lipoprotéines de haute densité (HDL) effectuent le transport inverse du cholestérol : elles l'entraînent vers le foie où il est éliminé (voir chapitre II, section 1.5). Une accumulation plasmatique de LDL-cholestérol, communément appelé « mauvais cholestérol », accélère le développement de l'athérosclérose [5].

L'hypercholestérolémie familiale est une évidence convaincante de l'effet néfaste des LDL, car les patients homozygotes souffrant de cette maladie présentent une concentration de LDL anormalement élevée et meurent jeunes de l'athérosclérose [5,6]. Par ailleurs, une accumulation plasmatique de HDL-cholestérol, communément appelé « bon cholestérol », ralentit le processus athéromateux et protège ainsi des MCV [7]. En 1988, l'importante *Framingham Heart Study* a confirmé qu'un haut niveau de HDL-cholestérol réduit significativement les risques de mourir d'une MCV [8].

L'hypertriglycéridémie est un second facteur de risque des MCV. Composés de trois acides gras fixés à un squelette de glycérol, les triglycérides sont des lipides plasmatiques dont le transport est aussi assuré par les lipoprotéines. Une étude du *Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM)* a montré une relation significative entre l'hypertriglycéridémie et les risques de MCV qui est indépendante du niveau de LDL-cholestérol et/ou de HDL-cholestérol [9].

Selon le *National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III [ATP III])*, les facteurs de risque des MCV sont le cholestérol total ($> 6,20$ mmol/L), le LDL-cholestérol ($> 4,13$ mmol/L), le HDL-cholestérol ($< 1,03$ mmol/L), les triglycérides ($> 2,26$ mmol/L), l'hypertension artérielle, les antécédents familiaux, le tabagisme, l'âge et le sexe masculin [4]. De nouveaux facteurs tels l'obésité, le diabète, l'homocystéine, la Lp(a), les mauvaises habitudes alimentaires et la sédentarité sont maintenant aussi considérés dans l'évaluation du risque de développer des MCV [10]. Enfin, la réputée *American Heart Association* estime que le syndrome métabolique est aussi un important facteur de risque de MCV.

De nos jours, deux classes principales d'agents hypolipidémiants (les statines et les fibrates) sont prescrites dans le but de réduire les risques de MCV. Les statines constituent une classe de médicaments qui inhibent l'HMG-CoA réductase, une enzyme impliquée dans la synthèse cellulaire du

cholestérol [11,12]. La méta-analyse de grandes études épidémiologiques portant sur les statines (*West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS)*, *Air Force Coronary Atherosclerosis Prevention Study/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TEXCAPS)*, *Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial*, *Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*, *Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) study*) indique que cette classe d'hypolipémiants est très efficace pour abaisser le niveau de LDL-cholestérol et qu'elle permet de diminuer les risques de MCV et de mortalité [11,12]. Les fibrates sont des agonistes synthétiques du *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α* et régulent la transcription des gènes impliqués dans le transport inverse du cholestérol [13]. Des études portant sur le gemfibrozil de la famille des fibrates (*Veterans Administration HDL Intervention Trial (Trial VA-HIT)*, *Helsinki Heart Study*) soutiennent que cette thérapie augmente significativement la concentration de HDL-cholestérol et réduit de manière efficace le niveau de triglycérides plasmatiques ainsi que les risques de MCV [13]. Plusieurs évidences illustrent donc le rôle important que jouent les lipides plasmatiques dans l'étiologie des MCV. Cependant, notre compréhension du métabolisme des lipides plasmatiques demeure incomplète et par conséquent, de nouvelles études sont nécessaires afin de préciser leurs mécanismes de régulation et leurs rôles.

Découverte dans les années 1970, l'apolipoprotéine C-I (apoC-I) est une petite protéine plasmatique qui participe à la formation des lipoprotéines (voir chapitre II, section 2.1). Elle est principalement associée aux HDL mais en état post-prandial, elle se redistribue sur les lipoprotéines de très basse densité (VLDL). L'effet de l'apoC-I sur les lipides plasmatiques ainsi que sur les enzymes impliquées dans leur métabolisme est partiellement établi et sera discuté dans la revue de littérature (chapitre II, section 2.3). Par contre, les facteurs pouvant contrôler la synthèse et la sécrétion de l'apoC-I par les différents tissus demeurent méconnus. Des expériences *in vivo* à l'aide d'un isotope stable ont montré une production accrue de l'apoC-I associée aux VLDL chez des patients hypertriglycéridémiques [14]. Ces résultats suggèrent que le

niveau de triglycérides est un déterminant important de la synthèse de l'apoC-I dans le foie.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier la régulation des niveaux de l'apoC-I dans les cellules hépatiques et ce, en observant l'effet de différentes conditions de culture sur les cellules HepG2 ainsi que sur les hépatocytes humains en culture primaire (voir chapitre III). De plus, une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 a été effectuée afin d'éclaircir le rôle de cette apolipoprotéine dans le métabolisme des lipides (voir chapitre IV).

II – Revue de la littérature

1. Les lipoprotéines

1.1 Structure des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules sphériques et hydrosolubles qui assurent le transport des lipides plasmatiques [15-19]. Leur surface polaire est composée de phospholipides, de cholestérol non-estérifié et d'apolipoprotéines (apo). Leur centre renferme un noyau insoluble de triglycérides et de cholestérol estérifié. La classification des lipoprotéines se fait généralement en fonction de leur densité, mais elles sont aussi séparées selon leur taille, leur mobilité à l'électrophorèse et leur teneur en lipides et en protéines [16,17].

Les chylomicrons sont synthétisés dans l'intestin et principalement composés de triglycérides alimentaires [16,17]. Ce sont d'énormes lipoprotéines ayant un diamètre supérieur à 100 nm et une densité inférieure à 0,98 g/ml. Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sont très riches en triglycérides et proviennent principalement du foie [16,17]. Elles ont un diamètre de 30 à 90 nm et une densité située entre 0,98 et 1,006 g/ml. Les lipoprotéines de faible densité (LDL), produites à partir du catabolisme des VLDL, sont les principaux véhicules du cholestérol dans le plasma [16,17]. Les LDL ont un diamètre d'environ 20 nm et une densité située entre 1,006 et 1,063 g/ml. Enfin, les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont synthétisées par le foie et l'intestin mais peuvent aussi se former à partir des constituants de chylomicrons et de VLDL libérés par la lipolyse [16,17]. Les HDL ont un diamètre de 8 à 12 nm et une densité située entre 1,063 et 1,21 g/ml. Riches en apolipoprotéines, phospholipides et cholestérol, elles sont les plus petites et les plus denses de toutes les lipoprotéines.

1.2 Fonctions des apolipoprotéines

Les apolipoprotéines sont des protéines ayant la capacité de lier certains lipides et de former des lipoprotéines solubles [15-19]. En plus d'être

impliquées dans la maintenance de la structure micellaire, les apolipoprotéines régulent l'activité des lipoprotéines et déterminent leur rôle dans le métabolisme des lipides. Plusieurs apolipoprotéines ont été identifiées. Elles diffèrent selon leur structure, leur fonction et leur distribution au sein des lipoprotéines. Certaines apolipoprotéines, telles l'apoB et l'apoE, jouent un rôle de transport et de redistribution des lipides entre les tissus [16]. Ces apolipoprotéines sont reconnues par des récepteurs localisés à la surface de cellules spécifiques et permettent ainsi aux lipoprotéines de distribuer leurs lipides. D'autres apolipoprotéines, comme l'apoA-I, l'apoA-II, l'apoC-I, l'apoC-II et l'apoC-III, ont une fonction de cofacteurs pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides [16]. Le tableau 1 résume les caractéristiques des principales apolipoprotéines plasmatiques humaines.

1.3 Métabolisme des chylomicrons

Lors de la digestion, les lipides alimentaires doivent être décomposés en leur plus simple unité afin d'être absorbés par les cellules intestinales [19]. Les triglycérides sont dégradés en monoglycérides par les lipases gastriques et pancréatiques. Le pancréas sécrète aussi la phospholipase A_2 et la cholestérol estérase qui réduisent les phospholipides en lysophospholipides et le cholestérol estérifié en cholestérol libre. Les lipides sont ensuite dispersés en micelles par les acides biliaires et sont absorbés par les entérocytes [19]. Deux transporteurs, les *fatty acid binding proteins* (FABP), permettent aux lipides de traverser le cytosol des entérocytes et d'atteindre le réticulum endoplasmique (RE) où ils sont reconstruits [20]. Dans le RE, les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol estérifié sont ensuite regroupés en chylomicron. Lors de leur formation, les chylomicrons acquièrent aussi les apolipoprotéines B-48, A-I, A-II et A-IV qui sont synthétisées par l'intestin et augmentent la solubilité des lipoprotéines [15]. De plus, l'apoB-48 est essentielle à la sortie du chylomicron dans la circulation, car cette protéine doit subir deux glycosylations avant que la lipoprotéine ne puisse être expulsée des entérocytes [21].

Tableau 1- Caractéristiques des principales apolipoprotéines plasmatiques humaines

Apolipo-protéine	Chromo- some	Nombre d'a. a.	Poids Moléculaire	Lieu de Synthèse	Lipoprotéines Majeures	Fonctions majeures	Références
A-I	11	243	28 100	Foie, Intestin	HDL, Chylomicrons	Structure des HDL, ↑ LCAT	[16, 18, 31, 55, 56]
A-II (dimère)	1	2 x 77	17 400	Foie, Intestin	HDL, Chylomicrons	Structure des HDL, ↑ HL, ↓ LCAT	[16, 18, 52, 56]
A-IV	11	391	44 500	Intestin	Chylomicrons, HDL	↑ LCAT	[16, 18]
B-48	2	2 152	241 000	Intestin	Chylomicrons, VLDL	Structure et sécrétion des chylomicrons	[16, 18, 21]
B-100	2	4 536	513 000	Foie	VLDL, IDL, LDL	Structure et sécrétion des VLDL, ligand du LDL-R	[16, 18, 22]
C-I	19	57	6 631	Foie, Intestin et autres	HDL, VLDL, Chylomicrons	↑ LCAT, ↓ LPL, ↓ CETP, ↓ catabolisme des TRL	[16, 18, 26-72]
C-II	19	79	8 824	Foie, Intestin	HDL, VLDL, Chylomicrons	↑ ou ↓ LPL selon sa concentration, ↓ LCAT	[16, 18, 28, 29, 31, 50, 51, 56, 134]
C-III ₀	11	79	8 750	Foie, Intestin	HDL, VLDL, Chylomicrons	↑ CETP, ↓ LPL, ↓ LCAT	[16, 18, 28, 29, 31, 49-51, 56, 134]
E	19	299	34 200	Foie Macrophages	Résidu de chylomicron, VLDL, HDL	Ligand du LDL-R, de la LRP et VLDL-R, ↓ LPL	[16, 18, 22, 66-71, 134]

↑ : activer ↓ : inhiber

Une fois dans le plasma, les chylomicrons acquièrent les apolipoprotéines C-I, C-II et C-III [15]. À la proximité des organes ciblés par les chylomicrons, la lipoprotéine lipase (LPL), activée par l'apoC-II, hydrolyse la membrane des lipoprotéines pour rendre les triglycérides accessibles et lipolyse ensuite les triglycérides en acides gras [15]. Les acides gras ainsi libérés se lient à l'albumine et s'accumulent dans les muscles comme source d'énergie, dans le tissu adipeux comme réserve de triglycérides et dans le foie pour la synthèse des VLDL [16]. Les résidus de chylomicrons demeurant dans la circulation incorporent l'apoE et du cholestérol estérifié provenant des HDL [22]. Ils sont ensuite rapidement captés par le foie grâce à deux récepteurs : 1) le récepteur LDL (LDL-R) qui reconnaît l'apoE et l'apoB, et 2) la protéine apparentée au récepteur LDL (LRP) qui reconnaît l'apoE seulement [22].

1.4 Métabolisme des lipoprotéines de très faible densité, des lipoprotéines de densité intermédiaire et des lipoprotéines de faible densité

Les VLDL sont synthétisées par le foie en échange de la prise des résidus de chylomicrons. Par conséquent, elles contiennent aussi beaucoup de triglycérides alimentaires. Dans le RE des hépatocytes, les VLDL formées incorporent l'apoB-100 et sont ensuite sécrétées dans la circulation où elles recueillent les apolipoprotéines C-I, C-II et C-III [15]. La dégradation plasmatique des VLDL est identique à celle des chylomicrons. La LPL, activée par l'apoC-II, lipolyse les triglycérides et cause ainsi une réduction de la taille des VLDL. Les lipoprotéines acquièrent ensuite l'apoE et deviennent des résidus de VLDL (β -VLDL) aussi nommés lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) [15,16]. Une grande partie des IDL est ensuite captée par le LDL-R et la LRP pour être dégradée dans le foie [22]. Par contre, certaines IDL subissent une lipolyse par la lipase hépatique (HL) et deviennent ainsi des LDL [23]. Les LDL sont remplies de cholestérol estérifié, contiennent une apoB-100 mais aucune apoE. Elles sont catabolisées par le LDL-R qui reconnaît l'apoB-100 [22]. Le foie capte 75% des LDL et transforme le cholestérol en acides biliaires

qu'il sécrète enfin dans l'intestin [15]. Le 25% de LDL restant dans la circulation est capté par tous les organes.

1.5 Métabolisme des lipoprotéines de haute densité

Les HDL proviennent du foie, de l'intestin et de la circulation grâce à la LPL qui dégrade les lipoprotéines de plus faible densité [16]. Les HDL naissantes ont une forme discoïdale et ne contiennent rien en leur centre [17]. Elles transportent surtout les apolipoprotéines A-I et A-II qui constituent 90% de la masse protéique des HDL [17]. Les HDL discoïdales s'enrichissent en cholestérol libre qu'elles soustraient aux cellules périphériques. L'afflux du cholestérol libre vers les HDL est facilité par un transporteur membranaire qui lie l'apoA-I : l'*adenosine triphosphate-binding cassette protein A1* (ABCA1) [23]. Dans la circulation, les HDL rencontrent ensuite la lécithine:cholestérol acyltransférase (LCAT), une enzyme plasmatique qui estérifie le cholestérol [23,24]. Le cholestérol estérifié étant très hydrophobe, il pénètre au centre des lipoprotéines ce qui transforme les HDL discoïdales en HDL₃ sphériques [17]. Les HDL₃ peuvent à leur tour capter du cholestérol et, après une nouvelle action de la LCAT, se transformer en lipoprotéines de plus en plus riches en cholestérol estérifié [17]. Les HDL₂ ainsi obtenues sont plus grosses et de plus faible densité que les HDL₃.

Les HDL₂ matures sont des réservoirs d'apolipoprotéines E, C-I, C-II et C-III qu'elles vont relayer aux autres lipoprotéines [17]. Une partie du cholestérol estérifié est aussi donnée aux chylomicrons et aux VLDL en échange de triglycérides. Cet échange est catalysé par la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) [23,24]. Les HDL₂, maintenant enrichies en triglycérides, sont hydrolysées sous l'action de la lipase hépatique et redeviennent des HDL₃ [23,24]. Les HDL₃ peuvent de nouveau aller recueillir du cholestérol tissulaire.

Finalement, le catabolisme des HDL s'effectue principalement dans le foie. Les HDL remplies de cholestérol estérifié sont captées par un récepteur

hépatique spécifique, le *scavenger receptor class B type 1* (SR-BI). Les SR-B1 puisent sélectivement le cholestérol estérifié des HDL et le transfèrent dans le foie (voir article de révision [25]). Le cholestérol estérifié est ensuite transformé en acides biliaires qui sont sécrétés dans le système digestif. Ce cycle de captation du cholestérol périphérique par les HDL et d'élimination par le foie est appelé le transport inverse du cholestérol [17,23].

2. L'apolipoprotéine C-I

2.1 Structure de l'apolipoprotéine C-I

Dans les années 1970, plusieurs groupes de chercheurs ont identifié une protéine qui compose les VLDL du plasma humain et possède une terminaison carboxyle riche en sérines : l'apolipoprotéine-sérine (apoLP-Ser) [26,27]. Toutefois, ils lui ont ensuite attribué le nom d'apolipoprotéine C-I, car sa distribution parmi les lipoprotéines et son faible poids moléculaire sont similaires à ceux de l'apolipoprotéine-acide glutamique (apoLP-Glu ou apoC-II) et de l'apolipoprotéine-alanine (apoLP-Ala ou apoC-III) [28]. La séquence complète des acides aminés et la structure primaire de l'apoC-I ont été rapportées pour la première fois par Jackson *et al.* en 1974 [26]. L'apoC-I (figure 1) consiste en une chaîne polypeptidique simple de 57 acides aminés et son poids moléculaire est de 6 613 Da [29]. Elle exhibe un haut pourcentage de lysines (16%) ce qui rend la protéine très chargée positivement [26,27]. Par contre, l'apoC-I ne contient pas de cystéine, de tyrosine, d'histidine ou de carbohydrate [26,27]. L'absence de tyrosine rend d'ailleurs son marquage très difficile ce qui complique l'étude de cette protéine. L'apoC-I présente une sérine à son extrémité COOH et une thréonine à son extrémité NH₂ [27].

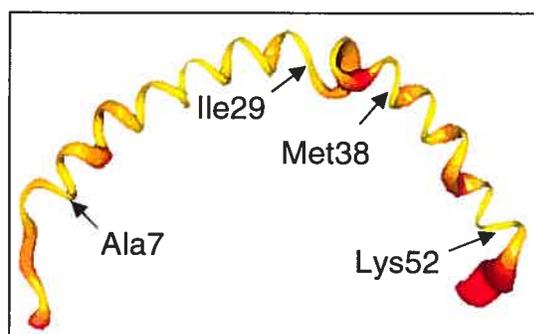


Figure 1 : Structure de l'apoC-I [30]

Les analyses par dichroïsme circulaire montrent que la structure secondaire de l'apoC-I comporte une importante proportion d'hélices α [31]. Ces hélices α , en opposant une face polaire et une non-polaire le long de leur axe, sont amphipatiques et il est suggéré que ces régions sont essentielles à la liaison des protéines aux lipoprotéines. En 1999, les travaux de Rozek *et al.* ont révélé que l'apoC-I forme deux hélices α (entre les résidus 7-29 et 38-52), séparées par une région inorganisée (entre les résidus 30-37) essentielle au positionnement des deux hélices [32]. Les résidus non-polaires des hélices amphipatiques établissent des interactions hydrophobes avec les chaînes d'acides gras des phospholipides. Les résidus polaires interagissent avec la partie hydrophile des phospholipides et la phase aqueuse. Ces interactions rendent les lipoprotéines stables et hydrosolubles.

2.2 Gène *APOC1*

L'apoC-I humaine est principalement synthétisée par le foie mais aussi par le tissu adipeux, les macrophages, la peau, les poumons, la rate, les testicules, et le cerveau [33]. Le gène codant pour l'apoC-I (gène *APOC1*) est localisé sur le chromosome 19, dans un *cluster* de 48 000 paires de base (figure 2) incluant les gènes de l'apoE, la pseudo-apoC-I', l'apoC-IV et l'apoC-II [33].

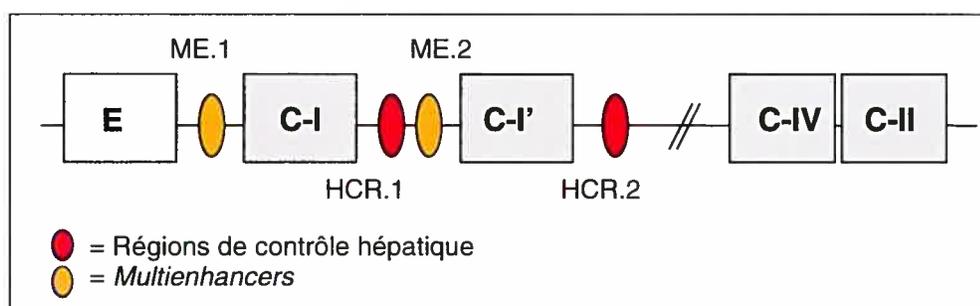


Figure 2 : *Cluster* incluant le gène *APOC1* [34]

Plus précisément, le gène *APOC1* comporte 4 653 paires de base [33]. Comme les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, C-II, C-III et E, la structure du gène de l'apoC-I consiste en une alternance de quatre exons et de trois introns [33,35]. Dans toutes ces apolipoprotéines, le troisième exon présente une

séquence conservée de 33 acides aminés (*common 33-codon block*) et les analyses de structure secondaire indiquent qu'elle forme une région bien définie dans le domaine N-terminal des apolipoprotéines [35]. De plus, le quatrième exon de toutes ces apolipoprotéines contient un tandem de 11 acides aminés répétés (*11-mer*) jouant un rôle dans la formation des hélices α amphipatiques [35]. La structure similaire des apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III et E suggère qu'elles ont évolué à partir d'un ancêtre commun [33,35].

La transcription du gène *APOC1* produit un ARN messager (ARNm) possédant un simple cadre de lecture de 249 bases et une queue poly(A) à l'extrémité 3' [36]. Dans le foie, le niveau d'ARNm de l'apoC-I est significativement supérieur à celui de l'apoE ou de l'apoA-II [36]. L'ARNm est ensuite traduit sous forme de précurseur (83 acides aminés) ayant un peptide signal (26 acides aminés) suivant le codon de départ méthionine à l'extrémité 5' [36]. Le précurseur subit ensuite un clivage protéolytique pour enlever le peptide signal et devenir l'apoC-I mature (57 acides aminés) [36].

L'expression du gène *APOC1* est régulée par différents mécanismes spécifiques au lieu de synthèse. Simonet *et al.* ont identifié deux régions de contrôle hépatique (HCR.1 et HCR.2) situées en aval du gène *APOC1* (~9 kb et ~20 kb respectivement) (figure 2) [37,38]. Les HCR sont des amplificatrices agissant en *cis* et régulant l'expression hépatique de tout le *cluster* E/C-I/C-IV/C-II. Les travaux de Allan *et al.* ont ensuite montré que chaque HCR, prise individuellement, peut coordonner l'expression des quatre gènes et que la présence d'au minimum une HCR est requise pour la transcription de ces gènes dans le foie [39]. De plus, leurs travaux proposent que la HCR.1 (319 paires de base) a un effet dominant sur l'expression des gènes E et C-I alors que la HCR.2 (632 paires de base) domine l'expression des gènes C-IV et C-II. Le mécanisme par lequel les HCR amplifient la transcription du gène *APOC1* n'est pas encore élucidé. Il a été suggéré que les protéines pouvant lier le motif répété TTTG de la HCR.1 introduirait un repliement de l'ADN [40]. Cela

permettrait d'orienter la région amplificatrice afin qu'elle puisse interagir avec les protéines du complexe transcriptionnel des apolipoprotéines.

Le *farnesoid X-activated receptor* (FXR) est un récepteur nucléaire qui, lorsque activé par un ligand comme l'acide biliaire, s'unit à un *retinoic acid receptor* (RXR) [41]. L'hétérodimère ainsi formé lie ensuite une région spécifique de l'ADN, c'est-à-dire un élément de réponse aux FXR, et active la transcription de gènes cibles. Un élément de réponse aux FXR est localisé dans les deux HCR et il a été démontré que, suite à l'activation du FXR par l'acide biliaire, les niveaux d'ARNm d'apoE et d'apoC-II augmentent dans le foie [41]. Il est suggéré que les FXR pourraient aussi être impliqués dans la régulation hépatique d'autres apolipoprotéines telle l'apoC-I.

Lors de la différenciation des monocytes en macrophages, les gènes *APOC1* et *APOE* sont activés de manière coordonnée [33]. Shih *et al.* ont démontré que l'expression des gènes *APOC1* et *APOE* dans les macrophages et le tissu adipeux est régulée par deux *multienhancers* (ME.1 et ME.2) situés de part et d'autre du gène *APOC1* (figure 2) [34]. Le *liver X-activated receptor* (LXR) est un autre récepteur nucléaire qui forme un dimère LXR/RXR après activation par un ligand (ex. oxystérol) et active la transcription des gènes ayant un élément de réponse aux LXR [41]. Un tel élément de réponse est localisé dans les deux ME situés près du gène *APOC1* [42]. C'est pourquoi l'expression des gènes *APOC1* et *APOE* dans les macrophages et les adipocytes est induite par les ligands des LXR [43].

Le *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) est aussi un récepteur nucléaire qui, après activation par un ligand, forme un dimère avec un RXR et active la transcription de gènes cibles. Galetto *et al.* ont rapporté la présence d'un élément de réponse aux PPAR γ situé entre les gènes *APOC1* et *APOE* qui pourrait réguler l'expression de ces deux gènes dans les tissus extra-hépatiques [44]. Par ailleurs, Andersson *et al.* ont démontré que les ligands (ex. fenofibrates) du PPAR α n'ont pas d'effet sur l'expression hépatique des gènes *APOC1* et *APOE* et qu'ils diminuent celle du gène *APOCII* [45].

Il existe aussi des éléments, situés entre les gènes *APOC1* et *APOE*, qui régulent positivement la transcription de ces deux gènes dans la peau [47]. Certains chercheurs suggèrent que la présence de l'apoC-I dans le cerveau, la rate, et les poumons est due à la présence de macrophages dans ces tissus [39]. Pourtant, les expériences de Turcotte-Petit *et al.* ont confirmé la synthèse de l'apoC-I dans les astrocytes [47]. Medstrand *et al.* ont proposé que la transcription de l'apoC-I dans le cerveau et autres tissus extra-hépatiques est dirigée par un promoteur alternatif (*long terminal repeat promoter*) dont la régulation diffère du promoteur classique qui est essentiel à la transcription de l'apoC-I dans le foie [48].

En résumé, le gène *APOC1* est situé très près (5 500 paires de base) en aval du gène *APOE* [33]. Ils ont la même longueur et sont dans la même orientation transcriptionnelle [33]. La transcription des deux gènes est régulée par les HCR dans le foie et par les ME dans le tissu adipeux et les macrophages [33]. Plusieurs chercheurs ont donc suggéré que la régulation des gènes *APOC1* et *APOE* est coordonnée [33].

2.3 Rôles biologiques de l'apolipoprotéine C-I

Bien que les rôles de l'apoC-I dans le métabolisme des lipides ne soient pas complètement élucidés, plusieurs fonctions biologiques de cette apolipoprotéine ont été démontrées *in vitro* et *in vivo* (voir article de révision [28]). En 1973, Havel *et al.* ont démontré *in vitro* que l'apoC-I réduit la lipolyse des VLDL en inhibant l'enzyme responsable [50]. En effet, à l'instar de l'apoC-III mais contrairement à l'apoC-II, l'apoC-I réduit l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL). Par la suite, d'autres laboratoires ont déterminé *in vitro* que l'apoC-I, comme l'apoC-II et l'apoC-III, inhibe la lipase hépatique (HL) [51,52]. Conde-Knape *et al.* ont confirmé *in vivo* la capacité de l'apoC-I d'inhiber la lipase hépatique [53]. Enfin, Poensgen *et al.* ont suggéré que l'apoC-I inhibe la phospholipase A₂ en lui bloquant l'accès aux phospholipides [54].

Dans les années 1970, plusieurs chercheurs ont démontré *in vitro* le rôle de l'apoC-I dans l'activation de l'enzyme LCAT [31,55,56]. Comme l'apoA-I, l'apoC-I participe à l'estérification du cholestérol qui est ensuite transféré aux HDL. Cependant, le potentiel d'activation de l'apoA-I et de l'apoC-I diffère selon la nature du substrat [55]. Les analyses par dichroïsme circulaire ont permis d'établir que l'activation de la LCAT par l'apoC-I et l'apoA-I dépend de leurs hélices amphipatiques [31].

En 1993, Kushwaha *et al.* ont trouvé chez une famille de babouins (*Papio sp.*) ayant un haut niveau plasmatique de HDL-cholestérol, une protéine de 4 kDa qui empêche le transfert du cholestérol estérifié des HDL vers les VLDL [57]. Cette protéine, qui inhibe l'activité de la CETP *in vitro*, correspond à l'extrémité NH₂ de l'apoC-I du babouin [57,58]. Plus tard, des expériences *in vitro* et *in vivo* menées par Gauthier *et al.* ont confirmé que l'apoC-I est un inhibiteur de l'activité de la CETP et ce, contrairement à l'apoC-III [59,60].

Au début des années 1980, plusieurs chercheurs ont démontré l'effet inhibiteur des apolipoprotéines C-I, C-II et C-III (apoCs) sur la captation des émulsions de triglycérides par les hépatocytes de rats dans un système *in vitro* de foie sous perfusion [61-65] ainsi que par les hépatocytes de rats et humains en culture [65,66]. Ils ont constaté que les apoCs diminuent la captation des émulsions seulement lorsque celles-ci sont supplémentées en apoE. Par conséquent, ils ont suggéré que les apoCs ont la capacité de déplacer l'apoE des émulsions pour prévenir son interaction avec les récepteurs hépatiques et ainsi empêcher la captation des lipoprotéines. Les expériences de Sehayek *et al.* avec des fibroblastes humains de peau ont confirmé ces résultats en précisant que l'apoC-I est la plus efficace des apoCs [67]. Leurs travaux ont montré que l'apoC-I inhibe la captation des lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) via le LDL-R. Ce récepteur ayant de l'affinité pour l'apoE et l'apoB, ils ont ensuite proposé que l'apoC-I empêche principalement la captation médiée par l'apoE. Clavey *et al.* ont confirmé que l'apoC-I, contrairement à l'apoC-III, a peu

d'effet sur l'interaction de l'apoB avec le LDL-R et par conséquent, n'affecte pas le catabolisme des LDL [68].

Parallèlement à ces recherches, il a été démontré *in vitro* que l'apoC-I inhibe la captation des résidus de chylomicrons et des β -VLDL (riches en apoE) par la LRP, un récepteur ayant de l'affinité uniquement pour l'apoE parmi toutes les apolipoprotéines [69-71]. Le mécanisme d'inhibition élaboré par Weisgraber *et al.* propose que l'apoC-I, en plus de déplacer l'apoE des TRL, masque ou altère sa conformation pour empêcher sa liaison avec la LRP [70].

Certains chercheurs ont démontré que l'apoC-I inhibe aussi la captation des lipoprotéines via le récepteur VLDL (VLDL-R) [72]. Le VLDL-R est principalement exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux [22]. Il présente une forte affinité pour les particules transportant l'apoE comme les chylomicrons et les VLDL mais non pas pour les LDL. [22] Il est proposé que le VLDL-R facilite la liaison des TRL pour permettre la distribution des acides gras libres aux tissus pouvant les métaboliser [22].

Pour la première fois en 1991, Simonet *et al.* ont observé *in vivo* que les souris transgéniques surexprimant l'apoC-I humaine ont un niveau de lipides plasmatiques plus élevé que les souris témoins [37]. La surexpression de l'apoC-I humaine dans les souris résulte en un excès d'apoC-I sur les TRL circulants, une altération de la captation des TRL par le foie, une accumulation des VLDL et des IDL dans le plasma et une élévation du cholestérol et des triglycérides totaux [37,73-75]. Par contre, l'apoC-I n'affecte pas la lipolyse des triglycérides dans les VLDL [75,76]. Les souris transgéniques surexprimant l'apoC-I montrent aussi une importante augmentation d'acides gras non-estérifiés dans leur plasma ainsi qu'une réduction de leur masse abdominale de tissu adipeux, et cela suggère que l'apoC-I interfère dans le transport des acides gras vers les tissus [76]. L'augmentation des lipides plasmatiques entraîne une augmentation du métabolisme du glucose (augmentation de la captation du glucose médiée par l'insuline) [76,77]. Cependant, cette hyperlipidémie primaire

ne conduit pas à une résistance à l'insuline ou à une haute pression sanguine [77]. Enfin, les souris surexprimant l'apoC-I développent une peau sèche et écailleuse ainsi qu'une perte de poils et une atrophie des glandes sébacées [76]. Ces résultats suggèrent que l'apoC-I affecte la synthèse des lipides dans les glandes sébacées et/ou dans l'épiderme.

Une surexpression de l'apoC-I humaine a aussi été effectuée dans des souris *ob/ob* (*ob/ob* / *APOC1+/+*) [78]. Les souris *ob/ob* sont déficientes en leptine et par conséquent, obèses. La surexpression de l'apoC-I chez celles-ci entraîne une diminution importante de poids corporel, une augmentation des triglycérides, du cholestérol et des acides gras libres plasmatiques et une diminution du glucose et de l'insuline plasmatique [78]. L'apoC-I pourrait donc avoir un effet protecteur contre l'obésité et la résistance à l'insuline. Par contre, un article publié récemment par le même groupe rapporte qu'une surexpression plus faible de l'apoC-I dans les souris *ob/ob* (*ob/ob* / *APOC1+/-*) provoque une diminution du poids, une augmentation des lipides, du glucose et de l'insuline plasmatiques et par conséquent, une résistance sévère à l'insuline [79].

Étonnamment, les souris n'exprimant pas d'apoC-I (*APOC1 gene knock out*) ne présentent qu'une très modeste élévation des triglycérides plasmatiques et aucune variation du cholestérol [80,81]. Lorsque ces souris sont soumises à une diète riche en gras, le cholestérol plasmatique augmente comparé aux souris témoins. Contrairement à ce qui était attendu, l'absence d'apoC-I entraîne donc aussi une diminution de la captation des lipoprotéines.

Il est aussi mentionné dans la littérature que l'apoC-I protège les cellules endothéliales des dommages causés par les LDL [82]. Curieusement, l'apoC-I active par ailleurs une voie de signalisation (*N-Smase-ceramide signaling pathway*) qui entraîne l'apoptose des cellules musculaires lisses de l'aorte et cause ainsi une rupture de plaque *in vivo* [83]. Il est donc difficile de porter un jugement sur l'effet, cardioprotecteur ou non, de l'apoC-I.

2.4 L'apolipoprotéine C-I chez l'humain

La concentration plasmatique et la distribution parmi les lipoprotéines de l'apoC-I ont été investiguées dans plusieurs études [84-95]. L'expression de l'apoC-I (comme l'apoC-II et l'apoC-III) augmente après la naissance [46]. Chez l'humain normolipidémique à jeûn, la concentration plasmatique de l'apoC-I se situe entre 4 et 9 mg/dL [85-88]. En comparaison avec les individus normolipidémiques, la concentration plasmatique de l'apoC-I est plus élevée chez les patients : 1) hypertriglycéridémiques souffrant d'une hyperlipoprotéïnémie de type IIb, IV ou V mais non chez les patients hypercholestérolémiques de type IIa [85], 2) hyperlipoprotéïnémiques de type III avec un surplus de résidus de lipoprotéines [89], 3) diabétiques [88], 4) déficients en glucose-6-phosphatase [90], 5) avec un défaut du rein ou maintenus en hémodialyse [91]. Par ailleurs, la quantité d'apoC-I est réduite chez les individus atteints de la maladie de Tangier et ayant une déficience en HDL [92]. Il a aussi été démontré que les hommes normolipidémiques qui développent une athérosclérose asymptomatique précoce, présentent un enrichissement en apoC-I sur les chylomicrons et les VLDL post-prandiaux (aucune augmentation exagérée des triglycérides) [93].

L'apoC-I se retrouve sur les HDL et les lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) nouvellement synthétisées [85,94-96]. La concentration plasmatique de l'apoC-I n'est pas influencée par le niveau de triglycérides plasmatiques mais après l'ingestion d'un repas riche en gras (100 g), la distribution de l'apoC-I parmi les lipoprotéines varie significativement [95]. À jeûn, deux tiers de l'apoC-I plasmatique sont associés avec les HDL et un tiers est distribué sur les TRL [85]. En état post-prandial, la quantité d'apoC-I associée aux TRL augmente de 37% alors que celle associée aux HDL diminue de 8% [95].

Dans notre laboratoire, des expériences *in vivo* à l'aide d'un isotope stable (leucine marquée avec deutérium) ont été effectuées chez des patients normolipidémiques, hypertriglycéridémiques (HTG) et hyperlipidémiques combinés (CHL) [14]. En comparaison avec les patients normolipidémiques, les

patients HTG et CHL présentait une augmentation significative de la quantité totale d'apoC-I plasmatique (7,9, 12,5, 12,4 mg/dL respectivement) causée par une augmentation significative de la concentration de l'apoC-I associée aux VLDL (0,3, 5,8 et 4,5 mg/dL respectivement). En comparaison avec les patients normolipidémiques, les patients HTG et CHL montraient une augmentation significative du taux de transport de l'apoC-I associée aux VLDL (0,24, 2,29 et 3,04 mg/kg.jour respectivement), mais aucun changement de son temps de résidence (0,74, 1,16 et 0,69 jours respectivement). Ces résultats démontrent une augmentation de la production de l'apoC-I associée aux VLDL chez les patients hypertriglycéridémiques (avec ou sans LDL-cholestérol élevé). Enfin, le niveau de l'apoC-I associée aux HDL est significativement inférieur chez les patients HTG et CHL et son transport est inversement corrélé aux niveaux de triglycérides (plasmatiques et associés aux VLDL).

Le gène *APOC1* présente peu d'anomalies chez l'humain. À ce jour, une seule étude a rapporté le cas d'une déficience en apoC-I et apoC-II chez des patients atteints de chylomicronémie familiale [97]. En comparant ces patients avec d'autres n'ayant qu'une déficience en apoC-II, une diminution significative du niveau de cholestérol estérifié, spécialement dans les HDL, a été observée.

Il existe aussi un polymorphisme *Hpa I* situé entre les gènes *APOC1* et *APOE* [98]. Ce site de restriction est produit par une insertion de 4 paires de base (CGTT) et il est localisé à 317 paires de base en amont du site d'initiation de la transcription du gène *APOC1* [99]. Xu *et al.* ont démontré que cette insertion (allèle H2) est associée avec une augmentation significative de la transcription du gène *APOC1 in vitro* [99]. Pour expliquer ces résultats, ils suggèrent que l'insertion prévient la liaison de certains facteurs d'inhibition de la transcription entraînant une surexpression de l'apoC-I. Ces chercheurs ont aussi démontré la présence d'un déséquilibre de liaison (association entre allèles présentes en deux locus polymorphes) entre le site *Hpa I* et les allèles du gène *APOE* : l'allèle H1 de l'*APOC1* est fortement associée à l'allèle $\epsilon 3$ de l'*APOE* alors que l'allèle H2 est liée aux allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 4$ [99]. Cette association

est plus forte chez les Européens-Américains que chez les Africains-Américains. Le plus faible déséquilibre de liaison entre les allèles de l'*APOC1* et de l'*APOE* (chez les Africains-Américains) a permis d'observer l'effet indépendant du polymorphisme de l'apoC-I. Les individus $\epsilon 3/\epsilon 3$ et porteurs de l'allèle H2 ont un niveau de triglycérides et d'apoB plus bas et un niveau de HDL plus élevé. Enfin, des expériences effectuées dans notre laboratoire ont démontré un déséquilibre de liaison entre les gènes *APOC1* et *APOE* chez les Canadiens-français [100]. Les résultats de ces expériences suggèrent que la concentration plasmatique de l'apoC-I est plus influencée par le génotype du gène *APOE* que par le polymorphisme *Hpa I* du promoteur du gène *APOC1*. Enfin, puisque l'allèle H2 de l'*APOC1* est associée à l'allèle $\epsilon 4$ de l'*APOE*, il est proposé que ce polymorphisme est un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer [101,102].

III – Régulation des niveaux de l'apolipoprotéine C-I dans les cellules hépatiques

1. Introduction

L'apolipoprotéine C-I joue un rôle important dans le métabolisme des triglycérides et du cholestérol plasmatiques (voir chapitre II, section 2.3). Cependant, la régulation de la transcription, de la synthèse et de la sécrétion de l'apoC-I par le foie demeure méconnue. Des expériences *in vivo* à l'aide d'un isotope stable effectuées chez des patients hypertriglycéridémiques ont montré une hausse de la production de l'apoC-I associée aux VLDL (voir chapitre II, section 2.4). Ces résultats suggèrent que le niveau de triglycérides hépatiques est un déterminant de la production de l'apoC-I dans le foie.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons observé l'effet de différentes conditions de culture sur les cellules HepG2 qui proviennent d'un hépatocarcinome humain et sont considérées comme un excellent modèle des hépatocytes humains [103]. Nous avons mesuré l'effet des lipoprotéines du sérum humain, des triglycérides sous forme d'Intralipid®, d'un mélange de cholestérol et de 25-hydroxycholestérol, du 25-hydroxycholestérol seul et de l'atorvastatine sur la quantité de lipides cellulaires ainsi que sur la production des apolipoprotéines C-I et E aux niveaux de l'ARNm et de la protéine. Les résultats de ces expériences ont été confirmés avec des hépatocytes humains en culture primaire.

2. Matériel et méthodes

2.1 Culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains

Les cellules HepG2 ont été obtenues chez *American Type Culture Collection* (Rockville, MD). Elles ont été maintenues dans un incubateur humidifié (37°C, 5% de CO₂) et cultivées dans du *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) faible en glucose acheté chez *Invitrogen* (Burlington, Ontario). Les milieux de croissance et d'expérimentation ont toujours été supplémentés en NaHCO₃ (3,7 g/l), acides aminés non-essentiels (100 µM), pénicilline (100 U/ml) et streptomycine (100 µg/ml). Pendant la croissance des cellules, du sérum bovin foetal (FBS) acheté chez *Sigma* (St-Louis, MO) a été ajouté pour avoir une concentration finale de 10% et le milieu a été remplacé tous les deux à trois jours. Avant chaque expérience, les cellules ont subi une tripsinisation et ont été transférées dans des plaques à six puits (environ un million de cellules par puits). Le milieu d'expérimentation a été ajouté trois à cinq jours plus tard lorsque les cellules ont atteint 70 à 80% de confluence.

Les hépatocytes primaires ont été isolés de patients ayant subi une chirurgie du foie et nous ont été offerts par le Dr Marc Bilodeau avec l'accord du Comité d'éthique de l'Hôpital St-Luc (Montréal, Québec) et le consentement des patients. Les hépatocytes primaires en culture primaire ont été cultivés dans du *William media E* acheté chez *Invitrogen* et supplémenté avec les mêmes additifs que le milieu de croissance des cellules HepG2. Avant de recevoir les cellules, les puits ont été enrobés avec une fine couche de collagène (5 µg *rat tail collagen type 1/cm*²) acheté chez *BD Biosciences* (Bedford, MA). La culture des hépatocytes primaires ainsi que l'extraction des protéines et de l'ARNm pour ces cellules ont été effectuées par Mme Geneviève Dubuc.

2.2 Effet de l'ajout de lipoprotéines dans le milieu de culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains

Le sérum humain a été isolé à partir de sang prélevé chez une femme normolipidémique. Il a ensuite été divisé en quatre fractions de 10 ml chacune auxquelles différentes concentrations de KBr ont été ajoutées afin d'obtenir les densités suivantes : 1,25 g/ml, 1,063 g/ml, 1,019 g/ml et 1,006 g/ml. Les fractions ont subi une ultracentrifugation (20 h à 312 000 g-force) et elles ont été dialysées dans une solution saline physiologique (0,15 M) afin d'enlever toute trace de KBr. Le sérum déficient en lipoprotéine (LPDS) a été obtenu à une densité de 1,25 g/ml, le sérum contenant uniquement des HDL à une densité de 1,063 g/ml, le sérum contenant des LDL et des HDL à une densité de 1,019 g/ml et le sérum complet à une densité de 1,006 g/ml [104]. La même procédure d'isolement des lipoprotéines a été utilisée avec le FBS afin d'obtenir le LPDS bovin.

Les cellules HepG2 ont été incubées 48 h dans un milieu d'expérimentation contenant 10% de LPDS humain, 10% de sérum humain avec HDL, 10% de sérum humain avec LDL et HDL ou 10% de sérum humain complet. Après cette période, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées deux fois dans 2 ml de *phosphate-buffered saline* (PBS). Du milieu frais sans sérum a enfin été ajouté pour 24 h. Ce milieu a été utilisé pour le dosage des protéines.

Les hépatocytes humains en culture primaire ont été incubés 18 h dans un milieu d'expérimentation contenant 50 μ M de mévastatine, 50 μ M de mévalonolactone, avec 10% de LPDS bovin ou 10% de FBS.

2.3 Effet de l'ajout de triglycérides sur le milieu de culture des cellules HepG2

Les cellules HepG2 ont été incubées 48 h dans un milieu d'expérimentation contenant 10% de FBS et différentes concentrations de triglycérides sous forme d'Intralipid© (0 μ M, 250 μ M ou 625 μ M). L'Intralipid©, obtenu chez *Baxter* (Toronto, Ontario), a été préalablement ultracentrifugé à une densité de 1,006 g/ml pour isoler les larges particules riches en triglycérides.

2.4 Effet de l'ajout de cholestérol dans le milieu de culture des cellules HepG2

Les cellules HepG2 ont été incubées 18 h dans un milieu d'expérimentation contenant 5% de LPDS bovin, 50 μM de compactine, 50 μM de mévalonolactone, avec ou sans un mélange de cholestérol (10 $\mu\text{g/ml}$) et de 25-hydroxycholestérol (1 $\mu\text{g/ml}$). Dans une deuxième expérience, les cellules HepG2 ont été incubées 48 h dans un milieu contenant 10% de LPDS bovin avec ou sans 25-hydroxycholestérol (10 $\mu\text{g/ml}$). Le cholestérol, le 25-hydroxycholestérol, la compactine et le mévalonolactone ont été achetés chez *Sigma*. Avant d'être ajoutés aux cellules, les stérols ont été dissous dans l'éthanol (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

2.5 Effet de l'ajout d'atorvastatine dans le milieu de culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains

Les cellules HepG2 ont été pré-incubées dans un milieu contenant 10% de LPDS bovin pour 24 h. Après cette période, le milieu a été remplacé par un milieu d'expérimentation pour 48 h. Ce milieu contenait 10% de LPDS bovin avec atorvastatine (10 μM) ou un mélange d'atorvastatine (10 μM) et de mévalonolactone (2,5 mM) ou sans agent pharmaceutique. Les statines ont été fournies par *Parke-Davis Pharmaceuticals Research* (Am Arbour, MI) et elles ont été dissoutes dans du méthanol (10 mM) avant d'être ajoutées aux cellules.

Après une pré-incubation de 12 h dans un milieu contenant 10% de LPDS bovin, les hépatocytes humains en culture primaire ont été incubés 24 h dans un milieu d'expérimentation contenant 1 μM atorvastatine (10 μM est toxique aux cellules).

2.6 Extraction et quantification des lipides cellulaires

Les cellules ont été lavées trois fois avec 2 ml de PBS. Ensuite, les lipides cellulaires ont été extraits en effectuant trois incubations d'une heure dans 1 ml d'hexane/isopropanol (3:2, vol/vol), à la température ambiante et sous agitation

douce [105]. Les lipides recueillis (3 ml) ont été centrifugés 10 min à 208 g-force. Les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes et évaporés sous jet d'azote gazeux dans un bain d'eau à 37°C. Le cholestérol total et les triglycérides ont été quantifiés par réaction enzymatique en utilisant les réactifs et standards de *Roche Diagnostics* (Indianapolis, IN). La lecture des densités optiques s'est faite à 500 nm pour le cholestérol et à 505 nm pour les triglycérides. Les lipides du FBS, du sérum humain et de l'Intralipid® ont aussi été mesurés de façon enzymatique.

2.7 Extraction et quantification des protéines

Les milieux d'expérimentation ont été collectés et les apolipoprotéines s'y trouvant ont été quantifiées par *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) [106]. En résumé, des anticorps polyclonaux de chèvre obtenus chez *Biodesign International* (Saco, ME) ont été déposés dans les puits des plaques et se sont accrochés au plastique. Après avoir lavé les plaques avec un tampon PBS (10 mM pH 7,4) contenant du tween (0,5 ml/l), un tampon PBS avec caséine (1 g/l) et merthiolate (0,1 g/l) a été ajouté aux puits afin de bloquer les sites non-spécifiques. Les échantillons, préalablement dilués dans un tampon PBS avec caséine (1 g/l), merthiolate (0,1 g/l) et tween (0,5ml/l), ont ensuite été appliqués et les apolipoprotéines spécifiques se sont accrochées aux anticorps. Après avoir lavé les plaques, des anticorps polyclonaux de chèvre conjugués à la *horseradish peroxidase* achetés chez *Academy Bio-Medical Company inc.* (Houston, TX) ont été ajoutés aux puits et se sont liés aux apolipoprotéines déjà fixées. Les plaques ont été lavées une dernière fois et un tampon citrate/phosphate (à pH 5,6 avec de l'*O-Phenylenediamine* et du H₂O₂) a été ajouté pour permettre de développer la plaque. Une fois la coloration désirée atteinte, la réaction a été arrêtée en appliquant une solution de H₂SO₄ (2,5 M) à tous les puits. La lecture des plaques au spectrophotomètre s'est effectuée à 490 nm. Les apolipoprotéines cellulaires ont aussi été quantifiées par ELISA. Les cellules ont été lavées trois fois avec 2 ml de PBS et récoltées. Elles ont ensuite été dissoutes dans un tampon de lyse (50 mM TRIS-Base, 150 mM KCl

et 1% Tween). Elles ont enfin été centrifugées et le surnageant recueilli a été mélangé au tampon de dilution susmentionné.

Afin de mesurer les protéines cellulaires totales, les cellules ont été lavées avec du PBS et solubilisées dans du NaOH (0,1 M). Les protéines ont ensuite été quantifiées selon la technique de Lowry *et al.* [107], en utilisant l'albumine bovine comme standard.

2.8 Extraction et quantification de l'ARN messenger

L'ARNm a été extrait avec du Trizol® selon les instructions du fournisseur *Invitrogen* et ensuite quantifié en utilisant un spectrophotomètre (à 260 nm et 280 nm). La qualité de l'ARNm a été vérifiée sur gel d'agarose 1% (tampon TAE 1X). Ensuite, une réaction de transcription inverse a été faite pour obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc a été amplifié avec une *polymerase chain reaction* (PCR) en temps réel en utilisant le *mastermix SYBR green* obtenu chez *Qiagen* (Mississauga, Ontario). Les résultats ont été analysés avec le *software Mx4000*. Le S14, une protéine ribosomale humaine, a été utilisé comme standard. Les amorces pour amplifier le gène S14 (5' : TGCAGAAATGGCACCTCGAA et 3' : TGCCTTTACCTTCATCCCACCA), le gène *APOC-I* (5' : CTTGGAAGGCCAGCCC et 3' : ATCTTGAGTTTCTCCTCC ACTTTCTG) et le gène *APOE* (5' : CCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGAC GTTT et 3' : GGGGGATCCTCGCGGGCCCCGGCCTGGTACA) ont été obtenues avec le programme *Primer 3* et synthétisées par *Invitrogen*.

2.9 Analyse statistique

Les moyennes \pm écart-type (SD) de la concentration des échantillons ont été comparées avec un t-test de Student.

3. Résultats

3.1 Effet de l'ajout de lipoprotéines dans le milieu de culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains

L'effet des lipoprotéines humaines sur la production des apolipoprotéines C-I et E par les cellules HepG2 a été étudié en incubant les cellules 48 h dans un milieu de culture contenant 10% de LPDS humain ou 10% de sérum humain complet. Avant leur ajout dans le milieu de culture, la concentration de triglycérides et de cholestérol des deux sérums a été dosée afin de connaître la quantité réelle de lipides ajoutés aux cellules. Le LPDS avait 0,01 mmol/l de triglycérides et 0,10 mmol/l de cholestérol, alors que le sérum complet avait 0,5 mmol/l de triglycérides et 4,2 mmol/l de cholestérol. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées 24 h dans un milieu de culture sans sérum. Après 36 heures, les cellules incubées en présence de lipoprotéines présentaient un niveau de triglycérides et de cholestérol cellulaires significativement supérieur (22%, $P < 0,05$ et 19%, $P < 0,01$, respectivement) à celui des cellules incubées dans le LPDS (graphique A, figure 3). Récolté après 24 h de culture sans sérum, le milieu des cellules préalablement incubées dans le sérum humain complet avaient une concentration significativement plus élevée des apolipoprotéines C-I et E (2,6 fois, $P < 0,001$ et 2,9 fois, $P < 0,001$, respectivement) (graphiques B et C, figure 3). Ces cellules montraient aussi une concentration d'apoC-I cellulaire faiblement mais significativement augmentée (8%, $P < 0,01$) mais aucune variation de l'apoE cellulaire (graphiques B et C, figure 3). Enfin, aucune différence significative du niveau d'ARNm de l'apoC-I ou de l'apoE n'a été observée entre les deux conditions d'expérimentation (graphique D, figure 3).

Afin d'investiguer l'effet de lipoprotéines spécifiques sur le métabolisme des lipides cellulaires et celui des apolipoprotéines C-I et E, le sérum humain a été fractionné par ultracentrifugation. Cela a permis d'effectuer une comparaison entre des cellules HepG2 incubées dans un milieu de culture contenant 10% de sérum déficient en lipoprotéines (LPDS humain),

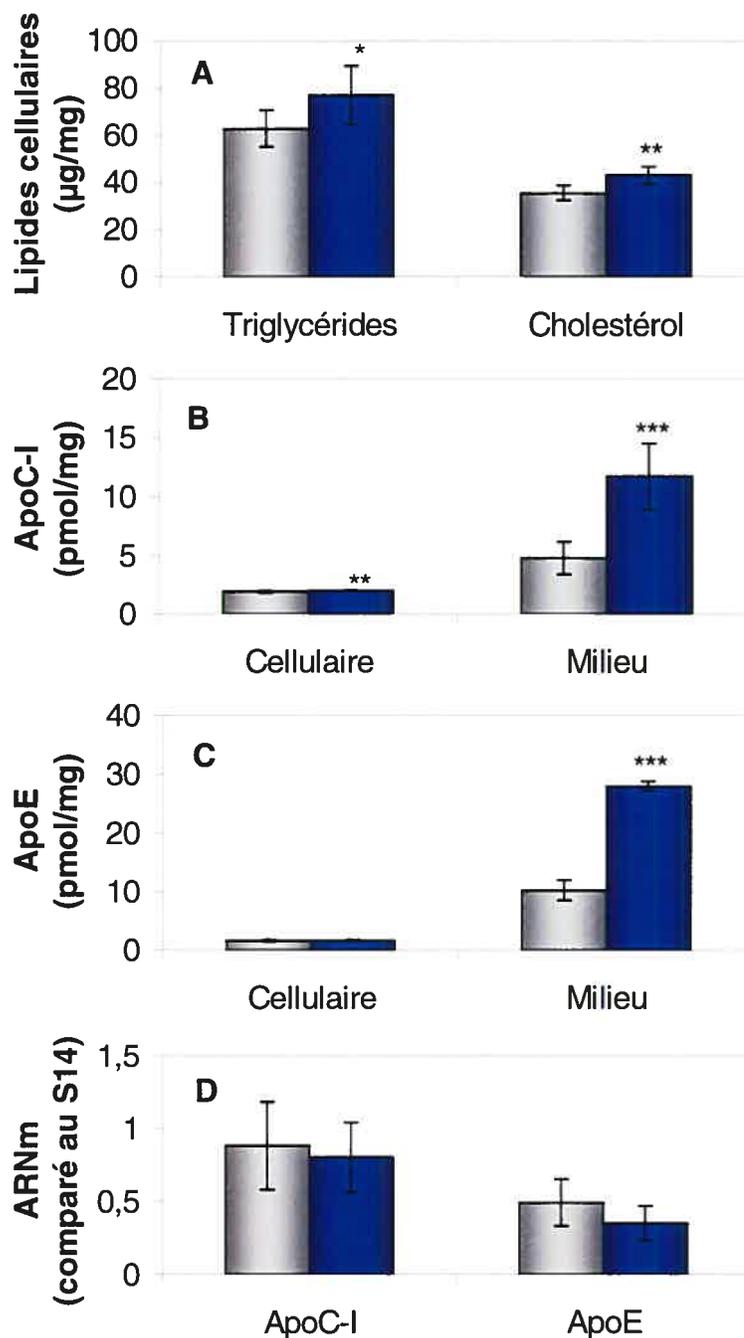


Figure 3 – Effet de l'ajout de lipoprotéines humaines dans le milieu de culture des cellules HepG2. Les cellules ont été incubées 48 h dans un milieu d'expérimentation contenant 10% de LPDS humain (gris) ou 10% de sérum humain complet (bleu). Du milieu frais sans sérum a ensuite été ajouté pour 24 h et a servi pour le dosage des protéines. Les résultats représentent la moyenne \pm SD pour 6 puits et sont représentatifs de plusieurs expériences. Significativement différent par t-test : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, et *** $P < 0,001$.

10% de sérum avec uniquement des HDL (LPDS humain + HDL) ou 10% de sérum contenant des LDL et des HDL (LPDS humain + LDL et HDL) (tableau 2). La concentration lipidique du sérum avec uniquement des HDL (triglycérides: 0,04 mmol/l, cholestérol: 1,11 mmol/l) et sérum contenant des LDL et des HDL (triglycérides: 0,13 mmol/l, cholestérol: 2,50 mmol/l) a été dosée avant qu'ils ne soient dilués dans le milieu de culture. Ces concentrations ont été choisies afin d'obtenir des niveaux de HDL et de LDL comparables à ce que l'on retrouve dans 10% de sérum humain complet.

La présence de HDL dans le milieu entraîne une augmentation significative des lipides et des apolipoprotéines C-I et E (dans les cellules et dans le milieu) mais aucun changement du niveau d'ARNm. Des changements similaires sont observés lorsque les cellules sont incubées en présence de LDL et de HDL, à l'exception d'une augmentation plus importante de l'apoE dans le milieu. Ces résultats démontrent tout d'abord que l'effet des lipoprotéines du sérum humain sur la synthèse et la sécrétion des apolipoprotéines C-I et E par les cellules HepG2 n'est pas dû à la présence des lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL et IDL). Les lipoprotéines riches en cholestérol (HDL et LDL) ont été capables d'enrichir les cellules de lipides et d'augmenter la production des apolipoprotéines C-I et E. Enfin, ces résultats démontrent que les lipoprotéines ont la capacité d'augmenter significativement la production d'apoC-I et d'apoE sans toutefois avoir un effet sur le niveau d'ARNm de ces apolipoprotéines.

Les lipoprotéines ont un effet comparable sur les hépatocytes humains en culture primaire qui ont été incubés 18 h dans un milieu contenant 10% de LPDS bovin ou 10% de FBS (tableau 3). En présence de lipoprotéines, les hépatocytes montrent une augmentation de 16% du cholestérol cellulaire et une diminution des triglycérides (29%, $P < 0,01$). Les lipoprotéines entraînent aussi une augmentation des apolipoprotéines C-I et E dans le milieu (165% et 46% respectivement, $P < 0,001$) mais n'affectent pas le niveau d'ARNm.

Tableau 2 – Effet de l'ajout de lipoprotéines humaines dans le milieu de culture des cellules HepG2

		LPDS humain	LPDS humain + HDL	LPDS humain + HDL et LDL
Cellulaire	Triglycérides (µg/mg)	63 ± 8	81 ± 6 **	82 ± 6 **
	Cholestérol (µg/mg)	36 ± 3	45 ± 10 *	52 ± 7 ***
	ApoC-I (pmol/mg)	1,9 ± 0,1	2,5 ± 0,1 ***	2,2 ± 0,1 ***
	ApoE (pmol/mg)	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1 *	2,0 ± 0,1 ***
Milieu	ApoC-I (pmol/mg)	5,1 ± 1,5	10,6 ± 1,5 ***	9,9 ± 1,9 ***
	ApoE (pmol/mg)	11,0 ± 2,0	17,4 ± 1,5 ***	35,3 ± 2,7 ***
ARNm	ApoC-I (comparé au S14)	0,88 ± 0,30	0,95 ± 0,35	1,01 ± 0,25
	ApoE (comparé au S14)	0,49 ± 0,16	0,52 ± 0,12	0,55 ± 0,14

Les cellules ont été incubées 48 h dans un milieu d'expérimentation contenant 10% de LPDS humain, 10% de sérum humain avec HDL, 10% de sérum humain avec LDL et HDL ou 10% de sérum humain complet. Du milieu frais sans sérum a ensuite été ajouté pour 24 h et a servi pour le dosage des protéines. Les résultats représentent la moyenne ± SD pour 6 puits et sont représentatifs de plusieurs expériences. Significativement différent du milieu avec LPDS par t-test : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Tableau 3 – Effet des lipoprotéines bovines sur les hépatocytes humains en culture primaire

		LPDS bovin	FBS
Cellulaire	Triglycérides ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	200 ± 25	$142 \pm 4^{**}$
	Cholestérol ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	$15,1 \pm 1,0$	$17,5 \pm 1,9$
Milieu	ApoC-I (pmol/mg)	$12,8 \pm 1,6$	$33,9 \pm 3,4^{***}$
	ApoE (pmol/mg)	$15,7 \pm 0,5$	$23,0 \pm 1,8^{***}$
ARNm	ApoC-I (comparé au	$1,0 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$
	ApoE (comparé au	$1,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,6$

Les hépatocytes humains en culture primaire ont été incubés 18 h dans un milieu d'expérimentation contenant 50 μM de mévastatine, 50 μM de mévalonolactone, avec 10% de LPDS bovin ou 10% de FBS. Les résultats représentent la moyenne \pm SD pour 3 puits. Significativement différent par t-test : $** P < 0,01$; $*** P < 0,001$.

3.2 Effet de l'ajout de triglycérides dans le milieu de culture des cellules HepG2

Pour confirmer que les triglycérides n'étaient pas responsables de l'augmentation de la production des apolipoprotéines C-I et E par les cellules HepG2, les cellules ont été incubées dans un milieu contenant 10% de FBS et différentes concentrations de triglycérides (0 μM , 250 μM , or 625 μM) sous forme d'Intralipid®. Dans les cellules, les triglycérides ont augmenté significativement (2,3 fois avec 250 μM et 2,8 fois avec 625 μM , $P < 0,001$), alors que le cholestérol a diminué (21% avec 250 μM , $P < 0,05$ et 32% avec 625 μM , $P < 0,01$) (graphique A, figure 4). La quantité d'apoC-I dans les cellules et dans le milieu a aussi diminué. En présence de 625 μM de triglycérides, le niveau d'apoC-I a diminué de 24% dans les cellules ($P < 0,01$) et de 26% dans le milieu ($P < 0,001$) (graphique B, figure 4). L'effet de l'Intralipid® sur la production de l'apoE était moins évident mais tout de même significatif, avec une diminution de 15% dans les cellules et une augmentation de 11% dans le milieu (graphique C, figure 4). Enfin, aucune différence significative du niveau d'ARNm de l'apoC-I ou de l'apoE n'a été observée (graphique D, figure 4).

L'Intralipid® est une émulsion de lipides à base d'huile de soja et de lécithine d'œuf purifiée, mais elle contient aussi de la glycérine anhydre. Afin de s'assurer que l'effet de l'Intralipid® sur les cellules HepG2 était bien dû à l'émulsion de triglycérides et non à la présence de glycérol dans le composé, les cellules HepG2 ont été incubées 48 h dans un milieu d'expérimentation contenant 10 mM de glycérol (résultats non présentés). Aucun changement significatif du cholestérol et des triglycérides cellulaires ainsi que des apolipoprotéines C-I et E (quantité dans les cellules et le milieu, et niveau d'ARNm) n'a été observé. Par conséquent, l'effet observé sur les cellules HepG2 après ajout des triglycérides sous forme d'Intralipid® est bien dû à l'émulsion lipidique et non à la présence de glycérol.

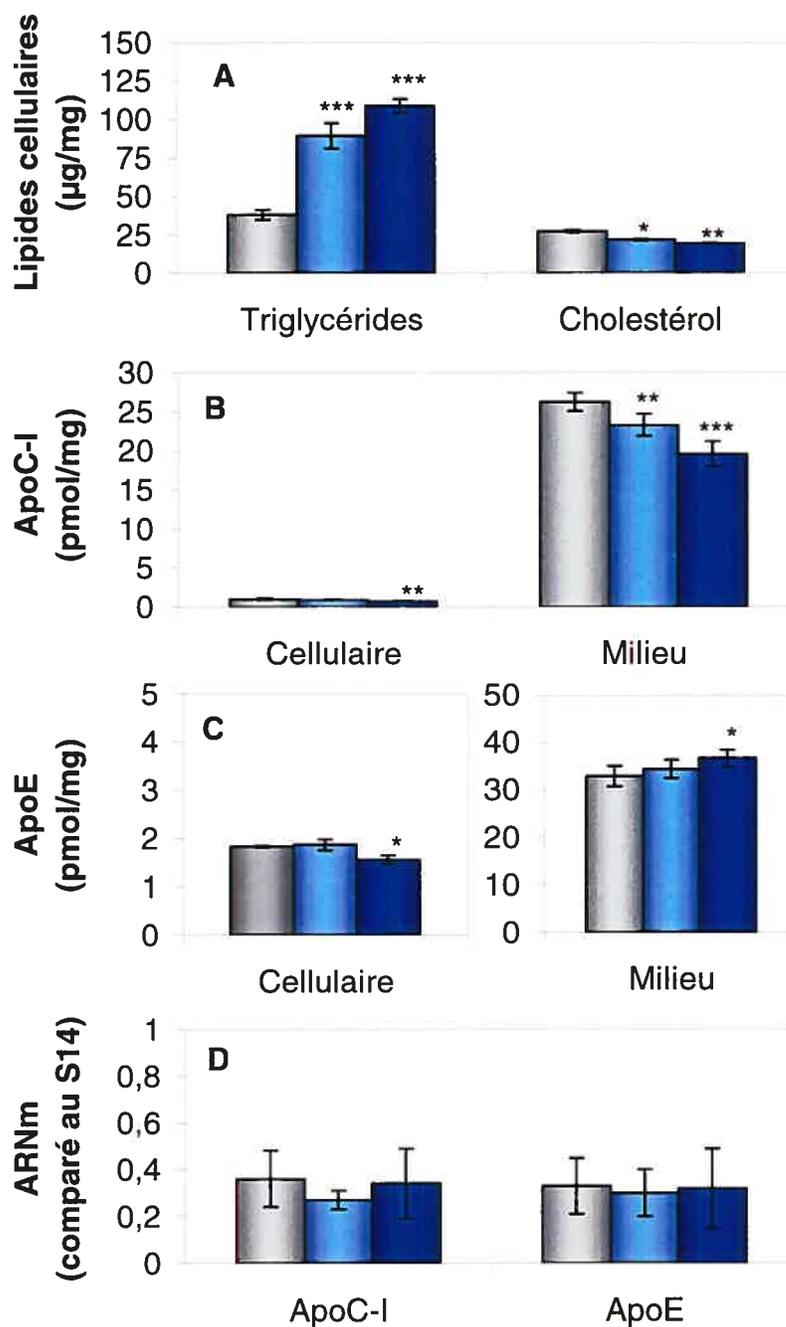


Figure 4 – Effet de l'ajout de triglycérides dans le milieu de culture des cellules HepG2. Les cellules ont été incubées 48 h dans un milieu d'expérimentation contenant 10% de FBS et différentes concentrations de triglycérides sous forme d'Intralipid® : 0 μM (gris), 250 μM (bleu pâle) ou 625 μM (bleu foncé). Les résultats représentent la moyenne ± SD pour 6 puits et sont représentatifs de plusieurs expériences. Significativement différent du milieu avec 0 μM de triglycérides par t-test : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$.

3.3 Effet de l'ajout de cholestérol dans le milieu de culture des cellules HepG2

Les résultats susmentionnés obtenus avec l'Intralipid© supportent le concept qu'une augmentation du niveau de triglycérides intra- ou extracellulaires n'entraîne pas une augmentation de la production de l'apoC-I par les cellules HepG2. Ces résultats suggèrent aussi que la production de l'apoC-I est plutôt liée à la quantité de cholestérol présente dans les cellules. Pour vérifier cette hypothèse, les cellules HepG2 ont été incubées dans un mélange de stérols (10 µg/ml de cholestérol et 1 µg/ml de 25-hydroxycholestérol) connu pour enrichir les cellules de cholestérol [108]. Effectivement, la quantité de cholestérol cellulaire a augmenté significativement de 21% ($P < 0,001$) tandis que les triglycérides ont diminué de 21% ($P < 0,001$) (graphique A, figure 5). Dans le milieu des cellules incubées en présence de stérols, la concentration d'apoC-I et d'apoE était aussi plus élevée de 38% et 123% respectivement (graphique B et C, figure 5). Encore une fois, aucun changement du niveau d'ARNm de l'apoC-I ou de l'apoE n'a été observé (graphique D, figure 5).

L'effet du 25-hydroxycholestérol seul a aussi été vérifié. Les cellules HepG2 incubées en présence de 25-hydroxycholestérol (10 µg/ml) ont montré une diminution significative du cholestérol cellulaire (26%, $P < 0,01$) (graphique A, figure 6) et de l'apoC-I dans le milieu (28%, $P < 0,01$) (graphique B, figure 6). Par contre, en présence de 25-hydroxycholestérol, la quantité d'apoE dans le milieu a significativement augmenté (graphique C, figure 6). À l'intérieur des cellules, le 25-hydroxycholestérol a causé une augmentation significative des apolipoprotéines C-I et E (graphiques B et C, figure 6). Enfin, le niveau d'ARNm de l'apoC-I et de l'apoE n'a pas changé.

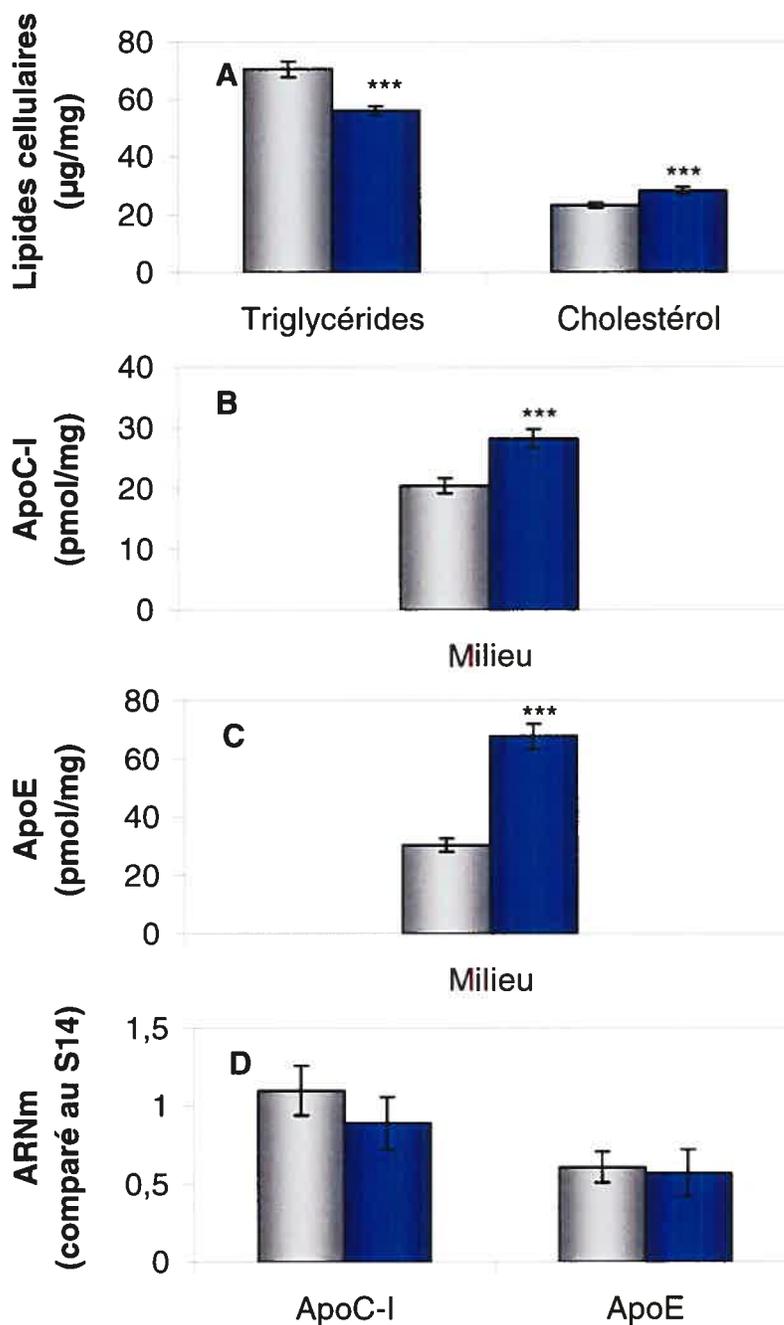


Figure 5 – Effet de l'ajout d'un mélange de stérols dans le milieu de culture des cellules HepG2. Les cellules HepG2 ont été incubées 18 h dans un milieu d'expérimentation contenant 5% de LPDS bovin, 50 μM de compactine, 50 μM de mévalonolactone, avec (gris) ou sans (bleu) un mélange de cholestérol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et de 25-hydroxycholestérol (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les résultats représentent la moyenne \pm SD pour 6 puits. Significativement différent par t-test : *** $P < 0,001$.

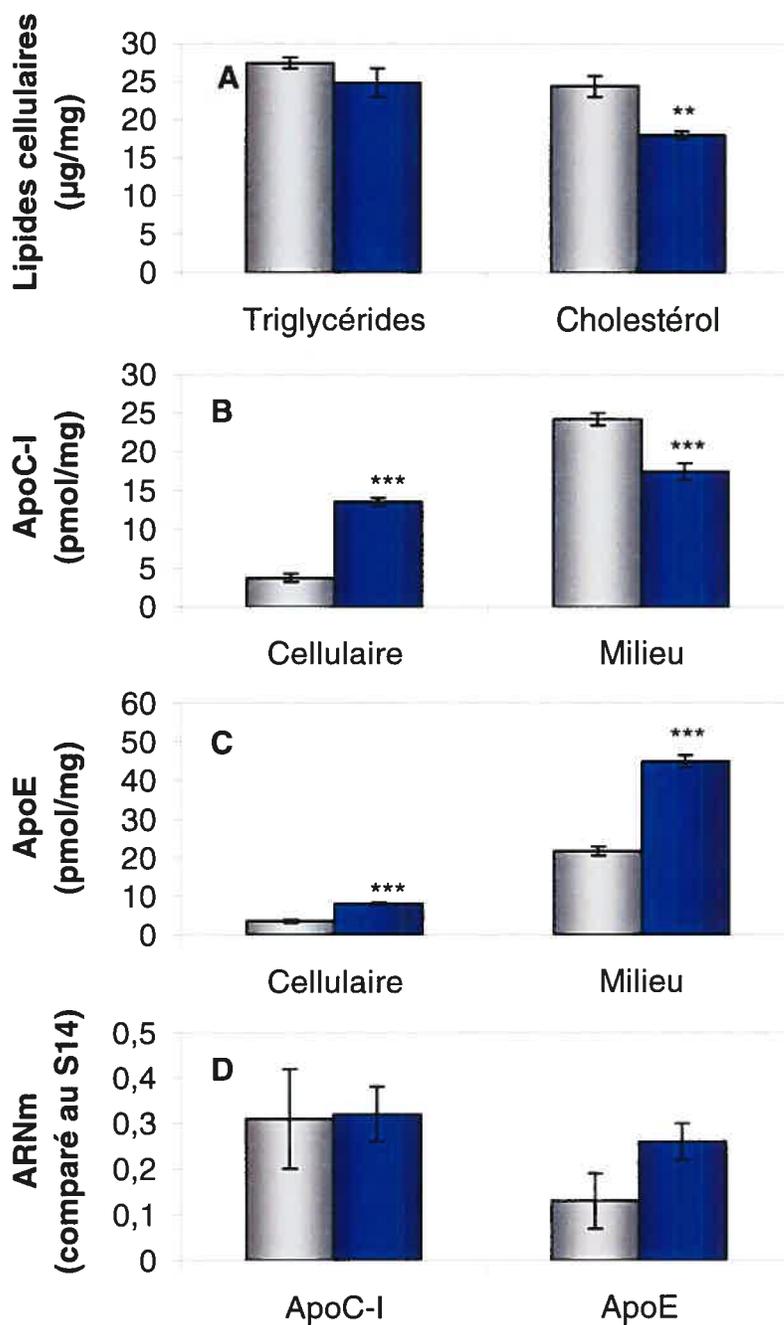


Figure 6 – Effet de l'ajout de 25-hydroxycholestérol dans le milieu de culture des cellules HepG2. Les cellules HepG2 ont été incubées 48 h dans un milieu d'expérimentation contenant 10% de LPDS (gris) ou 10% de LPDS et 10 µg/ml de 25-hydroxycholestérol (bleu). Les résultats représentent la moyenne ± SD pour 6 puits et sont représentatifs de plusieurs expériences. Significativement différent par t-test : ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$.

3.4 Effet de l'ajout d'atorvastatine dans le milieu de culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains

Afin de confirmer le lien entre le cholestérol intracellulaire et la production de l'apoC-I, les cellules HepG2 ont été incubées en présence d'atorvastatine (10 μ M) qui a la capacité d'inhiber l'HMG-CoA réductase, une enzyme responsable de la synthèse du cholestérol cellulaire [109]. Les cellules HepG2 ont aussi été incubées dans un mélange d'atorvastatine (10 μ M) et de mévalonolactone (2,5 mM), un composé qui permet d'abolir l'effet de l'atorvastatine [109]. En comparaison avec les cellules non traitées, les cellules traitées avec atorvastatine avaient un niveau de cholestérol cellulaire significativement inférieur (24%, $P < 0,05$) et de triglycérides significativement supérieur (28%, $P < 0,05$) (graphique A, figure 7). Cet effet a été renversé par l'ajout du mévalonolactone (graphique A, figure 7). Les cellules traitées avec l'atorvastatine montraient également une diminution de la quantité des apolipoprotéines C-I et E dans le milieu (20% et 13% respectivement, $P < 0,05$). Cet effet a aussi été aboli par l'addition de mévalonolactone (graphiques B et C, figure 7). Enfin, l'atorvastatine n'a pas influencé la quantité cellulaire des apolipoprotéines C-I et E (graphiques B et C, figure 7) de même que leur niveau d'ARNm (graphique D, figure 7).

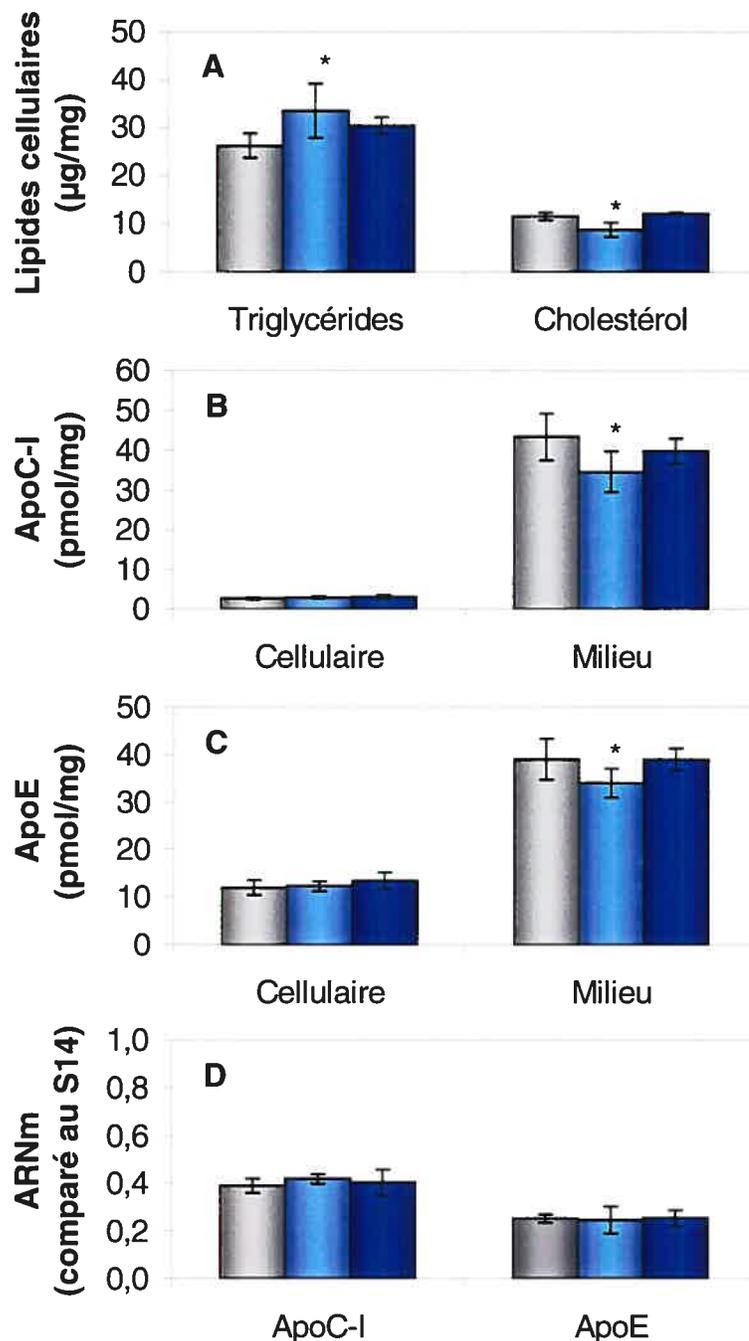


Figure 7 – Effet de l'ajout d'atorvastatine dans le milieu de culture des cellules HepG2. Après une pré-incubation dans un milieu contenant 10% de LPDS bovin pour 24 h, le milieu a été remplacé par un milieu d'expérimentation pour 48 h. Ce milieu contenait 10% de LPDS sans atorvastatine (gris), avec 10 μ M d'atorvastatine (bleu pâle) ou avec 10 μ M d'atorvastatine et 2,5 mM de mévalonolactone (bleu foncé). Les résultats représentent la moyenne \pm SD pour 6 puits et sont représentatifs de plusieurs expériences. Significativement différent par t-test : * $P < 0,05$.

L'atorvastatine a un effet semblable sur les hépatocytes humains en culture primaire (tableau 4). Après une pré-incubation de 12 h dans un milieu contenant 10% de LPDS bovin, les hépatocytes humains ont été incubés 24 h dans un milieu d'expérimentation contenant 1 μ M d'atorvastatine. Différentes de celles employées pour traiter les cellules HepG2, cette durée d'incubation et cette concentration d'atorvastatine ont dû être adoptées, car des expériences préliminaires ont démontré que les hépatocytes humains en culture primaire sont très fragiles. L'atorvastatine a causé une diminution du cholestérol cellulaire de 15% associée à une diminution des apolipoprotéines C-I et E dans le milieu (23% et 22% respectivement, $P < 0,001$). Comme attendu, l'atorvastatine n'a pas affecté le niveau d'ARNm de l'apoC-I mais étonnamment, a entraîné une diminution de l'ARNm de l'apoE ($P < 0,05$).

Tableau 4 – Effet de l'atorvastatine sur les hépatocytes humains en culture primaire

		LPDS	LPDS avec 1 μ M d'atorvastatine
Cellulaire	Cholestérol (μ g/mg)	14,1 \pm 0,9	12,0 \pm 0,7
Milieu	ApoC-I (pmol/mg)	15,7 \pm 0,9	12,1 \pm 0,6 ***
	ApoE (pmol/mg)	16,5 \pm 0,6	12,8 \pm 0,6 ***
ARNm	ApoC-I (comparé au S14)	1,0 \pm 0,7	1,1 \pm 0,4
	ApoE (comparé au S14)	1,0 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2*

Après une pré-incubation de 12 h dans un milieu contenant 10% de LPDS bovin, les hépatocytes humains en culture primaire ont été incubés 24 h dans un milieu d'expérimentation contenant 1 μ M atorvastatine. Les résultats représentent la moyenne \pm SD pour 3 puits. Significativement différent par t-test : * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

4. Discussion

Une étude *in vivo* effectuée dans notre laboratoire a démontré une augmentation de la production de l'apoC-I associée aux VLDL chez les individus hypertriglycéridémiques (voir chapitre II, section 2.4). Basé sur ces résultats, nous avons initialement émis l'hypothèse que la quantité de triglycérides hépatiques est un important déterminant de la synthèse et de la sécrétion de l'apoC-I dans le foie. Cependant, les résultats présentés dans ce chapitre ne supportent pas cette hypothèse. En effet, différentes expériences réalisées avec des cellules HepG2 et des hépatocytes humains en culture primaire ont démontré que la production hépatique de l'apoC-I est plutôt dépendante du niveau de cholestérol dans le foie.

Des essais préliminaires ont confirmé que la synthèse et la sécrétion de l'apoC-I sont accrues lorsque des lipoprotéines sont ajoutées au milieu de culture des cellules HepG2 et des hépatocytes humains en culture primaire. Les différentes classes de lipoprotéines ont ensuite été séparées du sérum humain afin d'observer l'effet de chacune d'entre elles sur la production de l'apoC-I par les cellules HepG2. Subséquemment, il a été démontré que les lipoprotéines riches en cholestérol, telles les LDL et les HDL, sont les plus aptes à augmenter le niveau de lipides cellulaires ainsi que la concentration de l'apoC-I dans les cellules et le milieu. Les lipoprotéines riches en triglycérides, comme les VLDL et les IDL, ne semblent pas être responsables de l'effet stimulant la production de l'apoC-I observé lors de l'ajout du sérum humain complet. Afin d'appuyer cette proposition, une émulsion de triglycérides (625 μ M) sous forme d'Intralipid® a été ajoutée au milieu des cellules HepG2 et a causé une augmentation significative des triglycérides cellulaires opposée à une diminution significative du cholestérol ainsi que du niveau de l'apoC-I dans les cellules et le milieu. Ces résultats suggèrent une fois de plus que la production hépatique de l'apoC-I est dépendante du niveau cellulaire de cholestérol plutôt que de triglycérides. Pour soutenir cette hypothèse, différents milieux d'expérimentation ayant pour effet d'augmenter significativement le niveau de

cholestérol cellulaire (avec le mélange de cholestérol et de 25-hydroxycholestérol) ou de le diminuer (avec le 25-hydroxycholestérol ou l'atorvastatine) ont été testés. Ces expériences ont confirmé que la production de l'apoC-I par les cellules HepG2 et les hépatocytes humains en culture primaire est reliée positivement à la quantité de cholestérol dans les cellules et non à la quantité de triglycérides. Enfin, dans toutes les expériences effectuées au cours de ce projet de maîtrise, aucun changement significatif du niveau d'ARNm de l'apoC-I n'a été observé, ce qui illustre l'importance des mécanismes post-transcriptionnels dans la régulation de la synthèse et de la sécrétion de l'apoC-I par les cellules hépatiques.

Contrairement aux rôles biologiques de l'apoC-I qui sont maintenant mieux déterminés, les facteurs affectant la synthèse et la sécrétion de cette apolipoprotéine demeurent peu connus. Plusieurs chercheurs ont proposé que la production de l'apoC-I est régulée de manière coordonnée avec celle de l'apoE (voir chapitre II, section 2.3). Sur le chromosome 19, les gènes *APOC1* et *APOE* sont séparés de quelques 5 300 paires de base et ils sont dans la même orientation transcriptionnelle [33]. Les deux gènes contiennent quatre exons et trois introns situés à la même position, et cela suggère qu'ils ont évolué à partir d'un ancêtre commun [35]. Dans le foie, deux régions de contrôle hépatique (HCR.1 et HCR.2) sont essentielles à leur transcription [37-40]. Dans le tissu adipeux et les macrophages, leur expression est régulée par deux *multienhancers* (ME.1 et ME.2) [34]. De plus, des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires FXR et LXR sont retrouvés dans les HCR et les ME respectivement [41-43]. Par ailleurs, la région située entre les gènes *APOC1* et *APOE* contient un élément de réponse aux PPAR γ fonctionnel [44]. Cependant, les fibrates, agonistes de PPAR α , n'affectent pas l'expression des deux gènes [45]. Les gènes *APOC1* et *APOE* partagent donc beaucoup de similarités quant à leur conformation et leur régulation. Cependant, dans les expériences présentées dans ce chapitre, le niveau d'ARNm des apolipoprotéines C-I et E ne varie jamais même si la quantité de ces deux apolipoprotéines dans les cellules et le milieu varie significativement. Ces résultats indiquent que la

production des apolipoprotéines C-I et E par les cellules hépatiques peut être contrôlée à un niveau post-transcriptionnel, et ils n'excluent pas la possibilité que les deux protéines soient régulées de manière coordonnée.

La régulation post-transcriptionnelle de l'apoE est beaucoup discutée dans la littérature. Plusieurs laboratoires ont établi que la production de l'apoE par les macrophages est contrôlée par différents mécanismes post-transcriptionnels. Tout d'abord, Wenner *et al.* ont démontré que l'apoE est ubiquitinée pour être ensuite dégradée dans le protéosome des macrophages [110]. En présence d'un inhibiteur de la dégradation protéosomale comme le lactacystin, l'apoE ubiquitinée s'accumule dans les cellules. Par la suite, d'autres ont montré qu'une portion importante de l'apoE nouvellement synthétisée par les macrophages est dégradée avant d'être sécrétée [111,112]. Les travaux de Mazzone *et al.* ont démontré que les macrophages incubés avec des HDL₃ humaines ou des vésicules de phosphatidylcholines présentent une augmentation de la sécrétion de l'apoE (sans altération du taux de recapture de cette protéine) ainsi qu'une diminution de la dégradation de l'apoE nouvellement synthétisée [111]. Ces résultats suggèrent que les molécules d'apoE, regroupées à la surface des macrophages, sont relâchées en présence d'un accepteur lipidique extracellulaire comme les lipoprotéines ou les vésicules de phospholipides. Duan *et al.* ont confirmé qu'une incubation des macrophages avec des stérols empêche la dégradation de l'apoE située dans la membrane cellulaire et stimule ainsi la sécrétion d'apoE [113]. Duan *et al.* ont aussi déterminé la nature du signal généré par les lipoprotéines qui induit l'inhibition de la dégradation intracellulaire. Ils ont découvert que l'effet des stérols sur la dégradation de l'apoE requiert la présence du domaine C-terminal de l'apoE, aussi essentiel à la liaison de l'apoE avec les lipoprotéines et le LDL-R. Leurs travaux suggèrent que l'interaction du domaine C-terminal de l'apoE avec les lipides altère la conformation du domaine et empêche ainsi la dégradation de l'apoE.

La régulation post-transcriptionnelle de l'apoE dans les hépatocytes a aussi été étudiée. Comme pour les macrophages, Wenner *et al.* ont établi que l'apoE subit une dégradation protéosomale dans les cellules HepG2 [110]. De plus, à l'instar des macrophages, une quantité importante de l'apoE nouvellement synthétisée par les cellules HepG2 n'est pas sécrétée et demeure associée à la surface des cellules [114]. La présence de HDL dans le milieu des cellules HepG2 augmente la sécrétion et diminue la dégradation de l'apoE [114]. Par ailleurs, les expériences de Craig *et al.* avec les cellules HepG2 ont démontré qu'une incubation en présence de résidus de chylomicrons ou de β -VLDL stimule la sécrétion de l'apoE, contrairement à une incubation avec des acides gras qui cause une faible diminution de la sécrétion [115]. Par conséquent, ces résultats suggèrent que le cholestérol présent dans les résidus de chylomicrons et les β -VLDL est nécessaire pour stimuler la synthèse et la sécrétion de l'apoE. Les travaux de Teramoto *et al.* ont confirmé que les cellules HepG2 incubées en présence de résidus de chylomicrons montrent une augmentation de l'apoE dans leur milieu sans variation du niveau d'ARNm de l'apoE [116]. Enfin, Shui *et al.* ont incubé les cellules HepG2 avec des LDL et ils ont observé une augmentation significative de la sécrétion de l'apoE sans aucun changement du niveau d'ARNm [117]. Ces résultats indiquent que dans les cellules HepG2 comme dans les macrophages, la production de l'apoE est régulée de manière post-transcriptionnelle par le cholestérol.

Cette conclusion concorde avec nos résultats, puisque lorsque nous avons incubé les cellules HepG2 avec des lipoprotéines riches en cholestérol (LDL et HDL), nous avons observé une augmentation significative de l'apoE dans les cellules et dans le milieu sans changement du niveau d'ARNm. En présence de cholestérol ou de 25-hydroxycholestérol, nous avons aussi observé une augmentation de la quantité d'apoE dans le milieu sans variation de l'ARNm. Cette sécrétion accrue en présence de cholestérol est probablement une conséquence de l'inhibition de la dégradation protéosomale. Cependant, d'autres mécanismes peuvent être impliqués et il demeure essentiel de les déterminer.

À ce jour, aucune publication n'éclaircit la régulation de la production de l'apoC-I dans les cellules HepG2. Les résultats de ce chapitre montrent que l'apoC-I augmente dans les cellules et le milieu en présence de lipoprotéines riches en cholestérol (LDL et HDL) ou d'un mélange de cholestérol et de 25-hydroxcholestérol. Il reste essentiel de déterminer si la dégradation protéosomale de l'apoC-I nouvellement synthétisée est un mécanisme contrôlant sa production nette dans les cellules HepG2 ainsi que dans les autres types cellulaires.

Dans un même ordre d'idées, nous avons observé qu'incuber les cellules HepG2 avec de l'atorvastatine cause une réduction du cholestérol cellulaire ainsi que de la sécrétion de l'apoC-I et de l'apoE. Des expériences effectuées dans notre laboratoire ont démontré que l'atorvastatine a un effet similaire sur les macrophages THP-1 [118]. Chez les patients hypertriglycéridémiques, l'atorvastatine a causé une importante diminution de la concentration de l'apoE (plasma total ou associée aux VLDL) et du taux de production de l'apoE (plasma total ou associée aux VLDL) [119]. Ces résultats suggèrent que dans le foie, le niveau de cholestérol cellulaire joue un rôle central dans la régulation de la sécrétion des apolipoprotéines C-I et E et cela se produit de manière indépendante de la transcription des gènes *APOE* et *APOC-I*. Plusieurs groupes ont déjà établi que les statines diminuent le taux d'apoB sécrétée par les cellules HepG2 et ce, sans affecter la transcription du gène *APOB* [120,121]. Subséquemment, il a été proposé que l'atorvastatine emprunte un mécanisme qui active la dégradation protéosomale de l'apoB dans les hépatocytes [121]. Il est donc vraisemblable que la régulation hépatique de la production de l'apoE et de l'apoC-I emprunte le même mécanisme et se produit en même temps et au même endroit que la dégradation de l'apoB. Cette voie de régulation est peut-être aussi très importante pour contrôler la sécrétion hépatique des triglycérides et des VLDL.

En résumé, les résultats présentés dans cette première partie de mémoire démontrent que le niveau de cholestérol cellulaire, plutôt que de triglycérides,

joue un rôle crucial dans le contrôle de la production de l'apoC-I et que cette régulation s'effectue de manière post-transcriptionnelle. Puisque, comme l'apoB, l'apoE est dégradée dans le protéosome et que cette dégradation permet de contrôler la sécrétion hépatique de cette protéine, notre hypothèse est que la sécrétion de l'apoC-I est contrôlée de la même façon. Des expériences additionnelles devront donc être effectuées afin de vérifier cette possibilité.

IV. Effet d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2

1. Introduction

Depuis une trentaine d'années, plusieurs chercheurs ont participé à l'identification des fonctions biologiques de l'apoC-I dans le plasma (voir chapitre II, section 2.3). Le rôle le plus important découvert jusqu'à présent demeure sa capacité d'inhiber la captation des lipoprotéines riches en triglycérides par le foie. Elle inhibe aussi la captation des acides gras plasmatiques par les adipocytes. Par ailleurs, l'apoC-I a une fonction de cofacteur pour différents enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides : elle active la LCAT et inhibe la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique et la CETP. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre l'effet de l'apoC-I sur les lipides intracellulaires ainsi que sur la production et le catabolisme des apolipoprotéines.

Le but d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 était donc d'étudier l'effet de l'apoC-I endogène sur le métabolisme des lipides intracellulaires de même que sur les principales apolipoprotéines synthétisées et sécrétées par le foie (apoB, apoC-III, apoE et apoA-I). De plus, nous avons observé l'effet de cette surexpression sur le niveau d'ARNm de l'apoE et des récepteurs LDL, LRP et VLDL.

2. Matériel et méthodes

2.1 Construction du plasmide

Des bactéries *Escherichia coli* transportant le vecteur pUCI-A4 ont été obtenues chez *American Type Culture Collection*. pUCI-A4 est un plasmide pUC8 qui contient le gène humain *APOC1* (0,42 kb), un gène de résistance à l'ampicilline et différents sites de restriction. Les bactéries ont été réhydratées dans du milieu *Luria-Bertani* (LB) contenant 50 µg/ml d'ampicilline obtenue chez *Stratagene* (Montréal, Québec). Pour confirmer la présence du gène *APOC1*, l'ADN plasmidique d'une fraction des bactéries a été extrait à l'aide d'un *QIAprep Spin Miniprep Kit* obtenu chez *Qiagen*, digéré par les enzymes de restriction EcoRI et HindIII (1h à 37°C) et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2% (dans tampon TAE 1X, 40 min à 80 volts). La fraction restante des bactéries a été multipliée. Ensuite, une quantité importante d'ADN plasmidique a été purifiée à l'aide d'un *Plasmid midi/maxi kit* acheté chez *Qiagen* et quantifiée par une lecture au spectrophotomètre à 260 et 280 nm. La présence du gène *APOC1* a été reconfirmée avec les mêmes enzymes de restriction.

Les plasmides pUC8 sont utilisés uniquement pour les transformations bactériennes. Par conséquent, le gène *APOC1* a dû être transféré sur un plasmide pcDNA3 permettant l'expression dans les cellules de mammifères. Obtenu chez *Invitrogen*, le pcDNA3 contient les promoteurs CMV, T7 et Sp6, plusieurs sites de restriction ainsi que des gènes de résistance à l'ampicilline et à la néomycine. Afin d'être linéarisé, les deux vecteurs ont été digérés par des enzymes de restriction (pUC8 : HindIII et pcDNA3 : BamHI et EcoRV) et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2%. Les bandes d'intérêts ont été récupérées et purifiées à l'aide d'un *QIAquick Gel Extraction Kit* acheté chez *Qiagen*.

Par la suite, les extrémités cohésives du plasmide pUC8 linéarisé ont été transformées en extrémités non-cohésives (*blunt ends*). L'ADN a été incubé

avec une polymérase (*large fragment DNA pol I*) et des dNTPs dans un tampon *Klenow* (30 min à 30°C et 10 min à 75°C pour inactivation de l'enzyme). Après électrophorèse, les bandes d'ADN ayant des extrémités non-cohésives ont été purifiées. Afin d'éviter une recircularisation de l'ADN plasmidique, les extrémités ont été phosphorylées avec une kinase (*T4 kinase*) et de l'ATP (1 h à 37°C et 10 min à 70°C pour inactivation de l'enzyme). Pour extraire le gène *APOC1* du plasmide pUC8 linéarisé, l'ADN a été digéré avec l'enzyme de restriction *BamHI* et soumis à une électrophorèse. La bande correspondant au gène *APOC1* a été récupérée, purifiée et quantifiée.

À cette étape, le gène *APOC1* et le pcDNA3 linéarisé possèdent une extrémité non-cohésive (ou *EcoRV*) et une extrémité *BamHI*. L'insertion du gène dans le plasmide s'effectue à l'aide d'une ligase (*T4 DNA ligase*) achetée chez *Invitrogen* (3 à 4 h à la température de la pièce). La transcription du gène *APOC1* dans le plasmide s'effectue dans la même orientation que dans la cellule et par conséquent, elle augmentera le niveau cellulaire d'ARNm de l'apoC-I.

Afin de multiplier le plasmide pcDNA3, des bactéries *Escherichia coli* compétentes ont été transformées avec le plasmide (1 h sur glace et 1 min à 42°C). Pour avoir le temps de fabriquer la β -lactamase qui confère la résistance à l'ampicilline, les bactéries ont été laissées 1 h dans du milieu LB ne contenant pas d'ampicilline (à 37°C). Elles ont ensuite été étalées sur des pétris d'agarose avec ampicilline (12 h à 37°C) et celles qui ont incorporé une copie ou plus du plasmide ont résisté à l'ampicilline. Quelques colonies ont été repiquées et multipliées dans du milieu LB avec ampicilline. Pour chaque colonie, la présence du gène *APOC1* à l'intérieur du plasmide pcDNA3 a été confirmée avec une mini-prep. Enfin, une maxi-prep a été effectuée pour isoler un maximum de plasmides et l'ADN a été quantifié.

2.2 Transfection des cellules HepG2

La transfection des cellules HepG2 s'est effectuée à l'aide de lipofectamine achetée chez *Invitrogen*. Les cellules ont été mises en plat de culture deux à

trois jours avant la transfection. À 70% de confluence, les cellules ont été lavées trois fois avec 5 ml de milieu Opti-MEM I Reduced-Serum acheté chez *Invitrogen*. Ce milieu ne contenait pas de FBS ni d'antibiotiques. Ensuite, 5 ml d'opti-MEM et 5 ml de complexe ADN/lipofectamine préparé selon le protocole d'*Invitrogen* ont été ajoutés aux cellules (3 h à 37°C). À la fin de cette période d'incubation, 10 ml d'opti-MEM contenant du FBS (10% du milieu total) ont été ajoutés. Après trois jours de croissance, le milieu a été changé pour un milieu de sélection contenant l'antibiotique néomycine (0,6 mg/ml) acheté chez *Invitrogen* et seules les cellules ayant incorporé une ou plusieurs copies du plasmide ont survécu. Chaque cellule s'est divisée pour former une petite colonie de cellules-filles toutes porteuses du même nombre de copies du gène *APOC1*. Après quelques jours, six colonies de cellules transfectées (S1 à S6) ont été isolées, multipliées et mises en plaques de six puits dans du milieu de maintien (0,3 mg de néomycine /ml). Entre 70 et 80% de confluence, du milieu de maintien frais a été ajouté pour 48 h.

2.3 Extraction et quantification des lipides, des protéines et de l'ARN messenger

Les lipides, les protéines ainsi que l'ARNm ont été extraits et quantifiés selon les méthodes décrites au chapitre III (section 2.6, 2.7 et 2.8). Les amorces pour amplifier le gène de résistance à la néomycine (5' : CATTTCGACCACCAAGCGAAACATC et 3' : ATATCACGGGTAGCCAACGCT ATG), le gène du LDL-R (5' : AGGAGACGTGCTTGTCTGTC et 3' : CTGAGCC GTTGTCGCAGT), le gène de la LRP (5' : CACCTTAACGGGAGCAATGT et 3' : GTCACCCCAGTCTGTCCAGT) et le gène du VLDL-R (5' : CGTACCCAGCAAT ATCAGTTGTAAGC et 3' : TGTTCTTCCAGCCGAGAGGAA) ont aussi été obtenues avec le programme *Primer 3* et synthétisées par *Invitrogen*. L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide d'un t-test de Student.

3. Résultats

Suite à la transfection, nous avons obtenu six lignées de cellules HepG2 surexprimant l'apoC-I et résistantes à la néomycine (S1 à S6). Des cellules HepG2 non-transfectées ainsi que des cellules HepG2 transfectées avec le vecteur pcDNA3 sans gène *APOC1* (lignée Vecteur) ont été préparées à titre de témoins. Toutefois, la lignée Vecteur a plus souvent été utilisée comme témoin, car cette lignée ne diffère des lignées S1 à S6 que par le gène *APOC1* inséré dans le pcDNA3. En effet, ces sept lignées ont subi exactement le même traitement et par conséquent la lignée Vecteur est un meilleur témoin négatif. Cependant, la lignée de cellules non-transfectées était aussi essentielle afin de vérifier si le plasmide pcDNA3 lui-même avait un effet sur le métabolisme des cellules HepG2.

Tout d'abord, le niveau d'ARNm du gène de résistance à la néomycine (néo) a été mesuré afin de vérifier quelle quantité de copies du plasmide a été incorporée dans chaque lignée cellulaire (tableau 5). Dans les cellules non-transfectées, la quantité d'ARNm néo est incontestablement nulle. Les lignées S1 et S3 ont un niveau extrêmement faible d'ARNm néo et cela suggère que ces lignées ont incorporé peu de copies du plasmide. Les lignées S2, S4 et S5 de même que la lignée Vecteur ont toutes un niveau comparable d'ARNm néo. Il est évident que la lignée S6 a eu le meilleur taux d'incorporation puisque sa quantité d'ARNm néo est deux fois plus élevée que celle des autres lignées.

La quantité d'ARNm de l'apoC-I a été évaluée pour chaque lignée (tableau 5). La valeur 1,00 a été attribuée au niveau d'ARNm des cellules non-transfectées. Ce rapport a permis de réunir les résultats des sept lignées et de les comparer entre elles. Comme attendu, la lignée Vecteur a un niveau d'ARNm de l'apoC-I semblable à celui des cellules non-transfectées (la faible diminution observée est non-significative). Dans les six lignées surexprimant l'apoC-I, le niveau d'ARNm de l'apoC-I est relativement proportionnel avec le niveau d'ARNm néo. Les lignées S4, S5 et S6 présentent la quantité la plus importante d'ARNm de l'apoC-I et ont par conséquent été sélectionnées pour

les analyses subséquentes. Enfin, il est intéressant de constater que dans toutes les lignées, le niveau d'ARNm de l'apoE est proportionnel avec ceux de néo et de l'apoC-I (tableau 5).

Tableau 5 – Effet d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 sur les niveaux d'ARNm néo, apoC-I et apoE.

Lignées cellulaires	ARNm néo (comparé au S14)	ARNm apoC-I (comparé au S14)	ARNm apoE (comparé au S14)
Cellules HepG2 non-transfectées	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,34	1,00 ± 0,21
Vecteur	0,20 ± 0,05 ***	0,73 ± 0,12	0,82 ± 0,22
S1	0,06 ± 0,02 ***	1,24 ± 0,27	1,34 ± 0,45
S2	0,14 ± 0,04 ***	1,79 ± 0,58 *	2,12 ± 0,65 **
S3	0,09 ± 0,03 ***	1,68 ± 0,54 *	1,77 ± 0,79
S4	0,17 ± 0,04 ***	2,04 ± 0,14 ***	1,86 ± 0,35 **
S5	0,15 ± 0,04 ***	1,97 ± 0,28 **	2,37 ± 0,48 ***
S6	0,43 ± 0,03 ***	17,44 ± 6,08 ***	7,78 ± 2,70 ***

Les résultats représentent la moyenne ± SD pour 5 puits. Significativement différent des cellules HepG2 non-transfectés par t-test : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$.

En comparaison avec les cellules HepG2 non-transfectées et la lignée Vecteur, les lignées surexprimant l'apoC-I (S4, S5, S6) présentent tout d'abord une augmentation des lipides cellulaires (tableau 6). Leurs triglycérides cellulaires sont 1,5 à 2 fois plus élevés et l'augmentation du cholestérol, bien que moins importante, est tout de même significative. À l'intérieur des cellules surexprimant l'apoC-I, la concentration des apolipoprotéines C-I et E est aussi faiblement plus élevée (tableau 6). La lignée S6, qui a la plus importante quantité d'ARNm de l'apoC-I, présente aussi la plus grande augmentation d'apoC-I cellulaire (40%, $P < 0,001$). Par contre, il n'y a pas de relation directe entre le niveau d'ARNm de l'apoC-I et la concentration d'apoC-I protéique dans les cellules. En effet, la lignée S6, qui exprime 8,5 fois plus d'ARNm de l'apoC-I que les lignées S4 et S5, présente à peine 32% plus d'apoC-I cellulaire que les deux autres lignées. Cela s'explique probablement par une activation de la dégradation de la protéine lorsque sa concentration cellulaire est fortement augmentée. Notons enfin que la lignée Vecteur a une concentration d'apoE cellulaire inférieure aux cellules non-transfectées mais que cet effet est renversé dans les cellules surexprimant l'apoC-I.

Tableau 6 – Effet d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 sur la quantité de lipides, d'apoC-I et d'apoE dans les cellules.

Lignées cellulaires	Triglycérides (µg/mg)	Cholestérol (µg/mg)	ApoC-I (pmol/mg)	ApoE (pmol/mg)
Cellules HepG2 non-transfectées	36,7 ± 3,6	32,4 ± 0,7	5,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1 ***
	40,6 ± 2,9	31,3 ± 1,3	5,3 ± 0,1	2,8 ± 0,1
S4	69,1 ± 4,7 ***	40,6 ± 1,2 ***	5,9 ± 0,6	4,0 ± 0,3 ***
S5	66,2 ± 6,0 **	37,6 ± 3,9 *	5,7 ± 0,5	3,7 ± 0,1 ***
S6	56,8 ± 6,0 *	38,0 ± 3,1 *	7,7 ± 0,3 ***	3,9 ± 0,1 ***

Les résultats représentent la moyenne ± SD pour 6 puits. Significativement différent de la lignée Vecteur par t-test : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$.

La surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 a aussi eu un effet sur la concentration des différentes apolipoprotéines présentes dans le milieu (tableau 7). Notons que la quantité d'apolipoprotéines dans le milieu de la lignée Vecteur est plus basse que celle des cellules HepG2 non-transfectées, ce qui suggère un effet du plasmide ou de la transfection sur le métabolisme des apolipoprotéines. Par conséquent, les lignées surexprimant l'apoC-I ont été comparées avec la lignée Vecteur afin de diminuer les risques de biais associés à la transfection. Au tableau 7, on observe que la quantité d'apoC-I dans le milieu des cellules surexprimant cette protéine a largement augmentée. En effet, le milieu des lignées S4, S5 et S6 contient 2 à 2,5 fois plus d'apoC-I que celui de la lignée Vecteur. Cependant, notons que comparativement à S4 et S5, la lignée S6 avec le plus d'apoC-I au niveau de l'ARNm et des protéines cellulaires, n'est pas celle avec le plus d'apoC-I dans son milieu. Les apolipoprotéines E, C-III, B ainsi que A-I sont toutes plus abondantes dans le milieu des cellules surexprimant l'apoC-I. Comparé à la lignée Vecteur, leur milieu contenait 2 à 2,5 fois plus d'apoE, 2 à 4 fois plus d'apoC-III, 2,5 à 3,5 fois plus d'apoB et environ 1,3 fois plus d'apoA-I.

Tableau 7 – Effet d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 sur la quantité des différentes apolipoprotéines présentes dans le milieu.

Lignées cellulaires	ApoC-I (pmol/mg)	ApoE (pmol/mg)	ApoC-III (pmol/mg)	ApoB (pmol/mg)	ApoA-I (pmol/mg)
Cellules HepG2 non-transfectées	55 ± 1 ^{***}	88 ± 2 ^{***}	35 ± 1 ^{***}	7 ± 1	281 ± 3
	39 ± 1	62 ± 2	25 ± 1	7 ± 1	285 ± 5
S4	95 ± 2 ^{***}	123 ± 4 ^{***}	103 ± 12 ^{***}	17 ± 1 ^{***}	395 ± 21 ^{***}
S5	94 ± 3 ^{***}	151 ± 2 ^{***}	64 ± 5 ^{***}	24 ± 1 ^{***}	344 ± 17 ^{***}
S6	81 ± 4 ^{***}	117 ± 5 ^{***}	49 ± 2 ^{***}	19 ± 1 ^{***}	353 ± 7 ^{***}

Les résultats représentent la moyenne ± SD pour 6 puits. Significativement différent de la lignée Vecteur par t-test : ^{***} $P < 0,001$.

Enfin, le niveau d'ARNm du LDL-R, du VLDL-R et de la LRP a été quantifié (tableau 8). On constate que la lignée Vecteur a des niveaux d'ARNm différents de ceux des cellules HepG2 non-transfectées et par conséquent, les lignées surexprimant l'apoC-I ont été comparées avec la lignée Vecteur. Les lignées surexprimant l'apoC-I semblent avoir une quantité plus élevée d'ARNm du LDL-R et de la LRP. Par contre, elles présentent une diminution significative de la quantité d'ARNm du VLDL-R.

Tableau 8 – Effet d'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 sur les niveaux d'ARNm du LDL-R, de la LRP et du VLDL-R.

Lignées cellulaires	ARNm LDL-R (comparé au S14)	ARNm LRP (comparé au S14)	ARNm VLDL-R (comparé au S14)
Cellules HepG2 non-transfectées	1,00 ± 0,13	1,00 ± 0,35 ***	1,00 ± 0,13
	0,80 ± 0,17	0,77 ± 0,12	1,46 ± 0,03
S4	1,42 ± 0,26 *	1,15 ± 0,08 **	0,98 ± 0,16 **
S5	0,84 ± 0,23	1,35 ± 0,35 *	0,10 ± 0,02 ***
S6	1,49 ± 0,23 **	1,29 ± 0,19 **	0,84 ± 0,16 ***

Les résultats représentent la moyenne ± SD pour 5 puits. Significativement différent de la lignée Vecteur par t-test : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5. Discussion

L'incorporation du plasmide contenant le gène *APOC1* dans les cellules HepG2 a entraîné une augmentation significative de l'apoC-I au niveau de l'ARNm, des cellules et du milieu. Contrairement à la quantité d'apoC-I dans le milieu, celle dans les cellules a augmenté proportionnellement au niveau d'ARNm d'apoC-I. En effet, les trois lignées qui surexpriment l'apoC-I à différent niveau ont une quantité similaire d'apoC-I dans leur milieu. Il semble que l'ARNm d'apoC-I en surplus dans les cellules est traduit en protéine mais toutes les protéines nouvellement synthétisées ne sont pas sécrétées. Ces résultats suggèrent que la régulation de la production de l'apoC-I s'effectue à un niveau post-traductionnel.

Il est maintenant établi que l'apoC-I inhibe la captation des lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) par le foie (voir chapitre II, section 2.3) [61-72]. En conséquence, les cellules hépatiques surexprimant l'apoC-I devraient montrer une augmentation des triglycérides dans leur milieu ainsi que des apolipoprotéines associées aux TRL, c'est-à-dire, l'apoB, l'apoC-III et l'apoE. Nos résultats confirment cette hypothèse, car il y a effectivement une augmentation de ces apolipoprotéines dans le milieu des cellules HepG2 surexprimant l'apoC-I. Cependant, nous avons aussi observé une augmentation de l'apoE au niveau de l'ARNm et des protéines cellulaires. Cette observation ne peut être expliquée par la proximité des gènes *APOC1* et *APOE* et leur co-régulation, puisque la technique employée pour transfecter les cellules HepG2 utilise des plasmides porteurs du gène *APOC1* seulement. Les gènes *APOC1* sont introduits au hasard dans le génome des cellules et ne se retrouvent donc pas à proximité du gène *APOE*. Bien que nos résultats aient été obtenus dans les cellules HepG2 qui ne sécrètent pas de TRL, ils suggèrent que la protéine apoC-I stimule de manière indirecte la transcription de l'apoE et peut-être aussi celle de l'apoB et de l'apoC-III. L'apoC-I, en inhibant la captation des TRL, pourrait entraîner une réaction (*feedback*) stimulant la synthèse des apolipoprotéines B, C-III et E. Par conséquent, l'augmentation des

apolipoprotéines associées aux TRL dans le milieu des hépatocytes peut être une conséquence de la capacité de l'apoC-I à inhiber la captation de TRL et à augmenter la transcription, la synthèse et la sécrétion de ces apolipoprotéines.

Les travaux de Charpentier *et al.* ont démontré qu'une surexpression de l'apoE dans les cellules HepG2 entraîne une augmentation de la dégradation des HDL riches en apoA-I et en cholestérol estérifié [122]. Puisque nous avons observé une augmentation de l'apoE au niveau de l'ARNm et des protéines dans les cellules surexprimant l'apoC-I, nous prévoyions retrouver une diminution de l'apoA-I et du cholestérol estérifié dans leur milieu. Au contraire, nos données indiquent une augmentation de l'apoA-I dans le milieu des cellules. Puisque les HDL sont catabolisées dans les cellules hépatiques via les récepteurs SR-BI, une première hypothèse est que l'apoC-I empêche la liaison des HDL avec le récepteur ou inhibe indirectement l'expression de SR-BI à la surface des cellules. Par ailleurs, nos résultats indiquent une augmentation du cholestérol intracellulaire dans les cellules HepG2 surexprimant l'apoC-I, ce qui a pour conséquence probable de réprimer la transcription des gènes contenant un *sterol regulatory element* (SRE). Le promoteur du gène SR-BI contient un SRE et la transcription du gène est par conséquent sensible au niveau de cholestérol cellulaire [25]. Lors d'une hausse de cholestérol cellulaire, l'expression du récepteur sur les membranes baisse et par conséquent, le catabolisme des HDL diminue. Une dernière possibilité pour expliquer la hausse d'apoA-I dans le milieu est que l'apoC-I stimule indirectement la transcription, la synthèse et la sécrétion de l'apoA-I comme l'apoE.

L'apoC-I inhibe la captation des TRL et par conséquent, les cellules surexprimant cette protéine devrait connaître une diminution des triglycérides et du cholestérol intracellulaires. Cependant, nos résultats indiquent que la concentration des lipides intracellulaires dans les cellules HepG2 surexprimant l'apoC-I est plus élevée que dans les cellules normales. Ne pouvant capter les TRL, les cellules surexprimant l'apoC-I voient leurs lipides intracellulaires diminuer et vont probablement utiliser d'autres voies afin de rétablir l'équilibre.

Les cellules peuvent augmenter le niveau de lipides cellulaires via les *sterol regulatory element-binding proteins 1c et 2* (SREBP-1c et SREBP-2). La SREBP est un facteur de transcription qui active plusieurs gènes impliqués dans l'homéostasie des lipides. La SREBP-1c intervient dans la régulation de la transcription des gènes requis pour la synthèse des triglycérides alors que la SREBP-2 active ceux du cholestérol. La SREBP est synthétisée sous forme de précurseur inactif lié à la membrane du RE. Elle est ensuite escortée vers l'appareil de Golgi par une *SREBP cleavage activating protein* (SCAP). Dans l'appareil de Golgi, la SREBP subit un clivage protéolytique qui lui permet de relâcher son domaine de liaison à l'ADN. Celui-ci peut ensuite se rendre au noyau et activer la transcription de gènes cibles. La SCAP possède un domaine de liaison à la SREBP et un domaine sensible aux stéroïdes lui permettant de réguler le transport de la SREBP. Lors d'une baisse de stéroïdes, le complexe SCAP/SREBP bourgeonne de la membrane du RE et la vésicule migre vers l'appareil de Golgi; alors qu'une accumulation de stéroïdes dans la cellule entraîne la rétention de la SCAP au RE. Cette voie permet de rétablir le niveau de lipides cellulaires (voir article de révision [87]). Cependant, nos résultats indiquent une hausse significative des lipides dans les cellules HepG2 transfectées par rapport aux non-transfectées, et la voie de SREBP est par conséquent insuffisante pour expliquer nos résultats.

Un deuxième mécanisme par lequel les cellules peuvent augmenter leur niveau de triglycérides et de cholestérol cellulaires consiste à stimuler la transcription et la synthèse du LDL-R et de la LRP et à augmenter ainsi la quantité de récepteurs à la surface des cellules hépatiques. Le LDL-R a de l'affinité pour l'apoE et l'apoB-100 alors que la LRP n'interagit qu'avec l'apoE. L'apoC-I empêche principalement la captation médiée par l'apoE, en masquant ou en altérant la conformation de cette protéine, mais a peu d'effet sur l'interaction de l'apoB-100 avec le LDL-R [70]. Nos résultats indiquent que les cellules surexprimant l'apoC-I ont un niveau d'ARNm du LDL-R et de la LRP plus élevé. L'augmentation de l'expression du LDL-R permettrait aux cellules d'augmenter le catabolisme des lipoprotéines contenant l'apoB-100 comme les

LDL. Par contre, il serait plus difficile d'expliquer l'augmentation de l'expression de la LRP, puisqu'en présence d'une haute quantité d'apoC-I, ce récepteur ne peut capter aucune lipoprotéine.

Enfin, les cellules HepG2 surexprimant l'apoC-I montrent une baisse du niveau d'ARNm du VLDL-R. L'apoC-I est reconnue pour bloquer la liaison entre l'apoE et le VLDL-R et empêcher ainsi la captation des TRL par les tissus [72]. Selon nos résultats, le mécanisme par lequel l'apoC-I inhibe la captation des TRL par le VLDL-R pourrait aussi impliquer une régulation négative de la production du récepteur. Le VLDL-R est surtout exprimé dans les tissus extra-hépatiques [22], aussi nos résultats reflètent-ils peut-être ce qu'une surexpression de l'apoC-I produirait dans d'autres tissus. Cela pourrait expliquer pourquoi les souris transgéniques ob/ob et surexprimant l'apoC-I subissent une perte de poids si drastique. L'apoC-I bloque l'apoE et diminue l'expression du VLDL-R à la surface des adipocytes, et par conséquent, aucun triglycéride ne peut être emmagasiné dans le tissu adipeux.

L'apoC-I semble avoir un effet évident sur l'accumulation extracellulaire des apolipoprotéines associées aux TRL et aux HDL ainsi que sur l'accumulation intracellulaire du cholestérol et des triglycérides. De plus, l'apoC-I stimule la synthèse de l'apoE et peut-être aussi celle d'autres apolipoprotéines. Enfin, en inhibant la captation des TRL médiée par l'apoE et en activant la synthèse du LDL-R, l'apoC-I pourrait augmenter le catabolisme des LDL. Des expériences additionnelles sont nécessaires afin d'éclaircir le rôle de l'apoC-I dans la régulation de la synthèse des apolipoprotéines, dans l'expression du récepteur SR-BI, dans l'interaction du SR-BI et des HDL ainsi que dans le métabolisme des lipides intracellulaires.

V – Discussion et conclusion

En résumé, les résultats présentés dans le chapitre III de ce mémoire indiquent que la production de l'apoC-I dans les cellules HepG2 et les hépatocytes humains en culture primaire est dépendante du niveau de cholestérol dans le foie. Lors d'une élévation des triglycérides cellulaires, les hépatocytes réduisent le niveau de cholestérol cellulaire ainsi que la synthèse de l'apoC-I. Par ailleurs, lorsque le niveau de cholestérol augmente, la production de l'apoC-I est accrue. Enfin, les expériences démontrent que les lipides régulent la production de l'apoC-I à un niveau post-transcriptionnel. Les résultats présentés dans le chapitre IV de ce travail indiquent qu'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 cause une augmentation du cholestérol et des triglycérides cellulaires. Les apolipoprotéines associées aux TRL (apoB, apoC-III et apoE) et aux HDL (apoA-I) sont aussi augmentées dans le milieu des cellules. Enfin, la surexpression de l'apoC-I augmente le niveau d'ARNm de l'apoE et du LDL-R mais diminue celui du VLDL-R.

Les résultats susmentionnés apportent de nouvelles évidences quant au métabolisme cellulaire de l'apoC-I. Néanmoins, plusieurs questions restent en suspens et des expériences additionnelles sont essentielles afin d'y répondre et de mieux comprendre la régulation et les fonctions de l'apoC-I. Premièrement, les effets de différentes conditions de culture sur les cellules hépatiques ainsi que sur les autres tissus pourraient être étudiés afin de mieux définir les facteurs régulant la transcription, la synthèse et la sécrétion de l'apoC-I. Il serait par exemple intéressant d'étudier l'effet de l'insuline sur l'apoC-I, une hormone hypoglycémiant importante dans le métabolisme des lipides. Des chercheurs ont constaté que l'insuline diminue la sécrétion de l'apoE par les cellules HepG2 sans affecter le niveau d'ARNm [124]. De plus, l'utilisation de méthionine radiomarquée permettrait d'observer avec plus de précision l'effet des différents facteurs métaboliques sur la synthèse *de novo*, la sécrétion et le catabolisme de l'apoC-I. La procédure consiste à ajouter la [³⁵S]méthionine au milieu de culture des cellules HepG2 pendant un certain temps, puis les cellules sont lavées et

incubées pendant un temps variable [114]. L'extrait cellulaire est ensuite immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-apoC-I, et après séparation électrophorétique sur gel dénaturant, la radioactivité présente dans l'immunoprécipitat est mesurée. Éventuellement, cette technique permettrait aussi d'observer l'effet de l'apoC-I sur la synthèse et la sécrétion des apolipoprotéines A-I, B, C-III et E, du LDL-R et du SR-BI par les cellules HepG2 surexprimant l'apoC-I.

Deuxièmement, pour déterminer quelle fraction du cholestérol cellulaire régule la production de l'apoC-I, il serait pertinent d'incuber les cellules HepG2 avec des liposomes contenant différentes proportions de cholestérol libre et estérifié. L'intérêt des liposomes se trouve dans leur membrane constituée de cholestérol et de phospholipides qui a une structure et une composition très semblables à celle de la membrane des cellules. Les liposomes sont donc facilement captés par les cellules, car ils pénètrent en fusionnant leur membrane avec celle des cellules. La préparation des liposomes se fait par sonication [125].

Troisièmement, puisque aucun des facteurs étudiés dans ce mémoire (voir chapitre III) a provoqué un changement du niveau d'ARNm de l'apoC-I, il semble crucial de déterminer les mécanismes intracellulaires de régulation post-transcriptionnelle de cette apolipoprotéine. Dans les cellules HepG2, l'apoE est ubiquitinée et ensuite dégradée dans le protéosome, mais en présence d'un inhibiteur de la dégradation protéosomale comme le lactacystin, l'apoE ubiquitinée s'accumule dans les cellules [110]. En incubant les cellules HepG2 avec le lactacystin, il serait donc possible de déterminer si, comme pour l'apoE, la dégradation protéosomale participe à la régulation post-transcriptionnelle de l'apoC-I.

Enfin, maintenant qu'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 a été obtenue, il serait intéressant de connaître l'effet d'une sous-expression de l'apoC-I sur le métabolisme des lipides et des apolipoprotéines. L'introduction dans les cellules d'un ARN interférence (ARNi), c'est-à-dire un ARN double brin homologue au produit du gène *APOC1*, interférerait avec

l'activité du gène et résulterait en une absence d'apoC-I endogène dans les cellules [126].

À la lumière de la revue de littérature (voir chapitre II) et des résultats (voir chapitres III et IV) présentés dans ce mémoire, l'apoC-I est-il pro-athérogénique ou anti-athérogénique chez l'humain ? Les souris transgéniques surexprimant l'apoC-I humaine présentent une augmentation des triglycérides et du cholestérol plasmatiques, car l'apoC-I inhibe la captation des TRL par le foie [61-72]. Cet effet de l'apoC-I sur les TRL peut être considéré pro-athérogénique puisqu'il existe une relation positive entre l'hypertriglycémie et le développement des MCV [8].

De plus, selon la littérature, l'apoC-I inhibe la lipoprotéine lipase (LPL), ce qui empêche l'hydrolyse des triglycérides dans les TRL [50]. Il a été démontré que l'absence d'une LPL fonctionnelle dans les souris entraîne une hypertriglycémie sévère ainsi qu'une diminution du HDL-cholestérol [127,128]. Par conséquent, l'apoC-I semble encore avoir un effet pro-athérogénique.

L'apoC-I intervient aussi dans le métabolisme des HDL. En activant l'enzyme LCAT, l'apoC-I augmente potentiellement le niveau de cholestérol estérifié dans les HDL [55,56]. Toutefois, la relation entre LCAT et le transport inverse du cholestérol ou l'athérosclérose reste à éclaircir. Une surexpression de LCAT dans les souris (qui n'expriment pas de CETP plasmatique fonctionnelle) n'augmente pas le transport inverse et entraîne le développement de l'athérosclérose [129]. Par ailleurs, dans les souris exprimant une CETP humaine, la surexpression de LCAT diminue l'athérosclérose [130]. Ces résultats suggèrent que l'effet anti-athérogénique de LCAT requiert la présence de la CETP. Cependant, l'apoC-I inhibe la CETP [57,58] et par conséquent, son effet sur les HDL demeure mitigé.

Par ailleurs, nos résultats montrent qu'une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 entraîne une augmentation de l'apoA-I dans le milieu des cellules. Si cette augmentation est due à un surcroît de sécrétion de l'apoA-I, alors l'effet pourrait être considéré anti-athérogénique. L'apoA-I est le principal constituant protéique des HDL et elle joue un rôle crucial dans le transport inverse en activant LCAT, ABCA1 et SR-BI (voir chapitre II, section 1.5). L'apoA-I semble protéger de l'athérosclérose, car les patients souffrant d'une déficience familiale en apoA-I développent des MCV prématurément [21]. Par contre, si l'augmentation de l'apoA-I est due à une diminution du catabolisme des HDL, l'effet de l'apoC-I serait plutôt pro-athérogénique. Le catabolisme des HDL s'effectue dans les hépatocytes via le récepteur SR-BI et les souris transgéniques déficientes en apoE et en SR-BI développent aussi des MCV prématurément (comparativement aux souris déficientes seulement en apoE) [131]. Il est à noter que les souris transgéniques surexprimant l'apoC-I humaine ne présentent aucun changement significatif du niveau de HDL-cholestérol [73]. Par conséquent, l'effet de l'apoC-I sur la concentration de l'apoA-I dans le milieu des hépatocytes et sur le métabolisme des HDL reste à éclaircir.

Nos résultats suggèrent aussi un rôle de l'apoC-I dans le métabolisme des LDL. Une surexpression de l'apoC-I dans les cellules HepG2 cause une augmentation du niveau d'ARNm du LDL-R. Si cet effet se traduit par une synthèse accrue du récepteur et de son expression à la surface des cellules, le catabolisme des LDL est alors probablement augmenté. Lorsque anormalement élevé, le LDL-cholestérol est la principale cause des MCV [4] et par conséquent, l'effet de l'apoC-I sur les LDL semble anti-athérogénique. Cependant, cet effet protecteur est mis en doute par les expériences de Shachter *et al.*, car ils ont démontré que les souris transgéniques surexprimant l'apoC-I humaine présentent une augmentation significative du LDL-cholestérol [73].

Nos résultats démontrent aussi qu'un surcroît d'apoC-I dans les cellules hépatiques entraîne une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de l'apoE. Ces résultats sont confirmés avec les souris transgéniques femelles

surexprimant l'apoC-I humaine qui présentent une augmentation significative du niveau hépatique d'ARNm de l'apoE [75]. Beaucoup de chercheurs ont étudié l'apoE et tous ont conclu que l'apoE a un effet anti-athérogénique [131,132]. En effet, l'apoE réduit le cholestérol plasmatique en facilitant la captation des résidus de lipoprotéines par le foie. De plus, l'apoE facilite la sécrétion du cholestérol cellulaire des cellules spumeuses macrophagiques présentes lors de la formation des plaques d'athéromes [131]. Enfin, dans les lésions athérosclérotiques, l'apoE diminue l'inflammation en modifiant directement la réponse immunitaire médiée par les macrophages et les lymphocytes T [131]. Bien que l'apoC-I empêche une des principales fonctions de l'apoE, soit la captation des TRL, l'augmentation de la production de l'apoE permettrait tout de même de diminuer directement l'athérosclérose.

Enfin, les souris transgéniques surexprimant l'apoC-I humain présentent une réduction de leur masse corporelle qui est associée à une diminution de la captation des acides gras libres par le tissu adipeux [78]. Cet effet de l'apoC-I semble anti-athérogénique, car il protégerait de l'obésité qui est un facteur de risque des MCV [10]. Cependant, la concentration plasmatique d'acides gras libres, de cholestérol et de triglycérides augmente significativement dans ces souris puisque le catabolisme des résidus de lipoprotéines dans le foie est inhibé. Koopmans *et al.* ont résumé qu'une surexpression de l'apoC-I dans les souris conduit à la dérégulation du métabolisme des VLDL et par conséquent à une hyperlipidémie primaire suivie d'une augmentation du métabolisme du glucose [77]. Cependant, leurs résultats indiquent que cette hyperlipidémie primaire ne résulte pas en une résistance à l'insuline et en hypertension. Par conséquent, l'apoC-I semble jouer un rôle important dans la protection contre l'obésité et la résistance à l'insuline.

En conclusion, la découverte de la régulation post-transcriptionnelle de l'apoC-I par le cholestérol intracellulaire est un nouveau pas dans la compréhension du métabolisme cellulaire de cette apolipoprotéine. Des expériences additionnelles seront nécessaires afin de déterminer d'autres

facteurs contrôlant la production de l'apoC-I et les mécanismes post-transcriptionnels impliqués dans cette régulation. De nouvelles expériences avec les cellules HepG2 surexprimant l'apoC-I ou déficientes en apoC-I permettront de mieux comprendre l'effet de l'apoC-I sur le métabolisme des lipides ainsi que son rôle dans l'étiologie des MCV.

VI – Bibliographie

1. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease study. *Lancet*. 1997; 349: 1498-1505.
2. Libby P. Atherosclerosis: the new view. *Sci Am*. 2002; 286: 46-55.
3. Ross R. Atherosclerosis – an Inflammation Disease. *New Engl J Med*. 1999; 340: 115-126.
4. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III [ATP III]). Executive summary, NIH Publication No. 01-3670, May 2001.
5. Rudel LL, Parks JB, Johnson FL, Babiak J. Low density lipoproteins in atherosclerosis. *J Lipid Res*. 1986; 27: 465-474.
6. Gotto AM, Phil D. Manual of lipid disorders. Éditions Williams & Wilkins, 1992, 95-115.
7. Meyers CD, Kashyap ML. Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins : recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection. *Curr Opin Cardiol*. 2004; 19: 366-373.
8. Kannel WB. Cholesterol and risk of coronary heart disease and mortality in men. *Clin Chem*. 1988; 34: B53-59.
9. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol*. 1996; 77: 1179–1184.
10. Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ESG, Kastelein JPP, Duriez P. New Risk Factors for Atherosclerosis and Patient Risk Assessment. *Circulation*. 2004; 109: III-15–III-19.
11. Thompson GR, Barter PJ. Clinical lipidology at the end of the millenium. *Curr Opin Lipidol*. 1999; 10: 521-526.
12. Gould AL, Rossouw JE, Santanello NC, Heyse JF, Furberg CD. Cholesterol Reduction Yields Clinical Benefit. Impact of Statin Trials. *Circulation*. 1998; 97: 946-952.

13. Chapman MJ. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidemia and future perspectives. *Atherosclerosis*. 2003; 171: 1-13.
14. Cohn JS, Tremblay M, Batal R, Jacques H, Veilleux L, Rodriguez C, Bernier L, Mamer O, Davignon J. Plasma kinetics of VLDL and HDL apoC-I in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects. *J Lipid Res*. 2002; 43: 1680-1687.
15. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1998; 27: 503-19.
16. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984; 25: 1277-1294.
17. Schaefer EJ. Les lipoprotéines de haute densité et insuffisance coronarienne. Gower Medical Publishing. 1990; 1-38.
18. Schaefer EJ, Eisenberg S, Levy RI. Lipoprotein apoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 1978; 19: 667-685.
19. Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, Brière R. *Physiologie humaine 3^e édition*. Chenelière/McGraw-Hill, 1995, 538-597.
20. Besnard P, Niot I, Poirier H, Clement L, Bernard A. New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine. *Mol Cell Biochem*. 2002; 239: 139-47.
21. Shaefer EJ. Lipoproteins, nutrition and heart disease. *Am J Clin Nutr*. 2002; 75: 191-212.
22. Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res*. 1997; 38: 2137-2191.
23. Rader DJ. Regulation of reverse cholesterol transport and clinical implications. *Am J Cardiol*. 2003; 92: 42J-49J.
24. Jin W, Marchadier D, Rader DJ. Lipases and HDL metabolism. *Trends Endo Met*. 2002; 13: 174-178.
25. Rhoads D, Brissette L. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. Defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 39-74.

26. Jackson RL, Sparrow JT, Baker HN, Morrisett JD, Taunton OD, Gotto AM Jr. The primary structure of apolipoprotein-serine. *J Biol Chem.* 1974; 249: 5308-5313.
27. Shulman RSm Herbert PN, Wehrly K, Fredrickson DS. The complete amino acid sequence of C-I (apoLp-Ser), an apolipoprotein from human very low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1975; 250: 182-190.
28. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of apoCs in lipoprotein metabolism. Functional differences between apoC1, apoC2, and apoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 472-484.
29. Jackson RL, Holdsworth G. Isolation and properties of human apolipoprotein C-I, C-II and C-III. *Meth Enzym.* 1986; 128: 288-297.
30. Cushley R. Nuclear Magnetic Resonance of the apolipoprotein C-I. Biological NMR Group, Simon Fraser University, Institute of Molecular Biology and Biochemistry. (<http://www.sfu.ca/~cushley>)
31. Jonas A, Sweeny SA, Herbert PN. Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem.* 1984; 259: 6369-6375.
32. Rozek A, Sparrow JT, Weisgraber KH, Cushley RJ. Conformation of human apolipoprotein C-I in a lipid-mimetic environment determined by CD and NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 1999; 38: 14475-14484.
33. Lauer S, Walker D, Elshourbagy NA, Reardon CA, Levy-Wilson B, Taylor JM. Two copies of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. *J Biol Chem.* 1988; 263: 7277-86.
34. Shih SJ, Allan C, Grehan S, Tse E, Moran C, Taylor JM. Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue. *J Biol Chem.* 2000; 275: 31567-31572.
35. Li HW, Tanimura M, Luo CC, Datta S, Chan L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure-function relationships and evolution. *J Lipid Res.* 1988; 29: 245-272.

36. Knott TJ, Robertson ME, Priestly LM, Wallis S, Scott J. Characterization of mRNAs encoding the precursor for human apolipoprotein C-I. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12: 3909-3915.
37. Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, Lauer SJ, Taylor JM. Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1991; 266: 8651-8654.
38. Simonet WS, Bucay N, Lauer SJ, Taylor JM. A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1993; 268: 8221-8229.
39. Allan CM, Taylor S, Taylor JM. Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coordinate the liver expression of the entire human apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster. *J Biol Chem.* 1997; 272: 29113-29119.
40. Zannis VI, Kan HY, Kristis A, Zanni E, Kardassis D. Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes *in vitro* and *in vivo*. *Curr Opin Lipidol.* 2001; 12: 181-207.
41. Edwards PA, Kast RH, Anisfeld AM. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J Lipid Res.* 2002; 43: 2-12.
42. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *PNAS USA.* 2001; 98: 507-512.
43. Mak PA, Laffite BA, Desrumaux C, Joseph SB, Curtiss LK, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P, Edwards PA. Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. *J Biol Chem.* 2002; 277: 31900-31908.
44. Galetto R, Albajar M, Polanco JI, Zakin MM, Rodriguez-Rey JC. Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region. *Biochem J.* 2001; 357: 521-527.
45. Andersson Y, Majd Z, Lefebvre AM, Martin G, Sechkin AV, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Staels B. Developmental and pharmacological

- regulation of apolipoprotein C-II gene expression. Comparison with apo C-I and apo C-III gene regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 115-121.
46. Zannis VI, Kan HY, Kristis A, Zanni E, Kardassis D. Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. *Front Bioscience.* 2001; 6: 456-504.
 47. Turcotte-Petit C, Stohl SM, Beffert U, Cohn JS, Aumont N, Tremblay M, Dea D, Yang L, Poirier J, Shachter NS. Apolipoprotein C-I expression in the brain in alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2001; 8: 953-963.
 48. Medstrand P, Landry JR, Mager DL. Long terminal repeats are used in alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in human. *J Biol Chem.* 2001; 276: 1896-1903.
 49. Shachter NS. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2001; 12: 297-304.
 50. Havel RJ, Fielding CJ, Olivecrona T, Shore VG, Fielding PE, Egelrud T. Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoprotein lipase from different sources. *Biochemistry.* 1973; 12: 1828-1833.
 51. Kinnunen PK, Ehnolm C. Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett.* 1976; 65: 354-357.
 52. Jahn CE, Osborne JC, Schaffer EJ, Brewer HB. Activation of the enzymatic activity of hepatic lipase by apolipoprotein A-II. *Eur J Biochem.* 1983; 131: 25-29.
 53. Conde-Knape K, Bendsoun A, Sobel JH, Cohn JS, Shachter. Overexpression of apoC-I in apoE-null mice: severe hypertriglyceridemia due to inhibition of hepatic lipase. *J Lipid Res.* 2002; 43: 2136-2145.
 54. Poensgen J. Apolipoprotein C-I inhibits the hydrolysis by phospholipase A2 of phospholipids in liposomes and cell membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1042: 188-192.

55. Soutar AK, Garner CW, Baker HN, Sparrow JT, Jackson RL, Gotto AM Jr, Smith LC. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*. 1975; 14: 3057-3064.
56. Albers JJ, Lin J, Roberts GP. Effect of human plasma apolipoproteins on the activity of purified lecithin:cholesterol acyltransferase. *Artery*. 1979; 5: 61-75.
57. Kushwaha RS, Hasan SQ, McGill HC Jr, Getz GS, Dunham RG, Kanda P. Characterization of cholesteryl ester transfer protein inhibitor from plasma of baboons (*Papio sp.*) *J Lipid Res*. 1993; 34: 1288-97.
58. Buchko GW, Rozek A, Kanda P, Kennedy MA, Cushley RJ. Structural studies of a baboon (*Papio sp.*) plasma protein inhibitor of cholesteryl ester transferase. *Protein Sci*. 2000; 9: 1548-1558.
59. Gautier T, Masson D, P. de Barros JP, Athias A, Gambert P, Aunis D, Metz-Boutigue, MH, Lagrost L. Human apolipoprotein C-I accounts for ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity. *J Biol Chem*. 2000; 275: 37504-37509.
60. Gautier T, Masson D, Jong MC, Duverneuil L, Le Guern N, Deckert V, et al. Apolipoprotein C-I deficiency markedly augments plasma lipoprotein changes mediated by human cholesteryl ester transfer protein (CETP) in CETP transgenic/ApoC-I-knocked out mice. *J Biol Chem*. 2002; 277: 31354-31363.
61. Windler E, Chao Y, Havel RJ. Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rat. *J Biol Chem*. 1980; 255: 5475-5480.
62. Windler E, Chao Y, Havel RJ. Regulation of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apolipoproteins. *J Biol Chem*. 1980; 255: 8303-8307.
63. Shelburne F, Meyers HJ, Quarfordt S. Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J Clin Invest*. 1980; 65: 652-658.

64. Quarfordt SH, Michalopoulos G, Schirmer B. The effect of human C apolipoproteins on the in vitro hepatic metabolism of triglyceride emulsions in the rat. *J Biol Chem.* 1982; 257: 14642-14647.
65. Quarfordt SH, Hanks J, Shelburne F, Schirmer B. Differing uptake of emulsion triglyceride by the fed and fasted rat liver. *J Clin Invest.* 1982; 69: 1092-1098.
66. Oswald B, Quarfordt SH. Effect of apoE on triglyceride emulsion interaction with hepatocyte and hepatoma G2 cells. *J Lipid Res.* 1987; 28: 798-809.
67. Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem.* 1991; 266: 18259-18267.
68. Clavey V, Lestavel-Delattre S, Copin C, Bard JM, Fruchart JC. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII and E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 963-971.
69. Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1990; 265: 10771-10779.
70. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowall RC, Herz J, Goldsetin JL, Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with β -migrating very low density lipoproteins (β -VLDL) and inhibits binding of β -VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1990; 265: 22453-22459.
71. Swaney JB, Weisgraber KH. Effect of apolipoprotein C-I peptides on the apolipoprotein E content and receptor-binding properties of β -migrating very low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 1994; 35: 134-142.

72. Jong MC, Dahlmans VEH, van Gorp PJJ, Willems van Dijk K, Hoopmans SJ, Chan L, Hofker MH, Havekes LM. The binding of VLDL to the VLDL receptor is inhibited by an excess of apoC1. *Circulation*. 1994; 94: I-698.
73. Shachter NS, Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Breslow JL, Ginsberg HN, Smith JD. Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J Clin Invest*. 1996; 98: 846-855.
74. Jong MC, Dahlmans VEH, van Gorp PJJ, Breuer ML, Mol MJTM, van der Zee A, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. Both lipolysis and hepatic uptake of VLDL are impaired in transgenic mice coexpressing human apolipoprotein E*3Leiden and human apolipoprotein C1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 934-940.
75. Jong MC, Dahlmans VEH, van Gorp PJJ, van Dijk KW, Breuer ML, Hofker MH, Havekes LM. In the absence of the low-density lipoprotein receptor, human apolipoprotein C1 overexpression in transgenic mice inhibits the hepatic uptake of very low density lipoproteins via receptor-associated protein-sensitive pathway. *J Clin Invest*. 1996; 98: 2259-2267.
76. Jong MC, Gijbels MJJ, Dahlmans VEH, van Gorp PJJ, Koopman SJ, Ponc M, Hofker MH, Havekes LM. Hyperlipidemia and cutaneous abnormalities in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J Clin Invest*. 1998; 101: 145-152.
77. Koopmans SJ, Jong MC, Que I, Dahlmans VEH, Pijl H, Radder JK, Frolich M, Havekes LM. 2001. Hyperlipidaemia is associated with increased insulin-mediated glucose metabolism, reduced fatty acid metabolism and normal blood pressure in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *Diabetologia*. 2001; 44: 437-43.
78. Jong MC, Voshol PJ, Muurling M, Dahlmans VEH, Romijn JA, Pijl H, Havekes LM. 2001. Protection from obesity and insulin resistance in mice overexpressing human apolipoprotein C1. *Diabetes*. 2001; 50: 2779-85.

79. Muurling M, van den Hoek AM, Mensink RP, Pijl H, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. Overexpression of APOC1 in obob mice leads to hepatic steatosis and severe hepatic insulin resistance. *J Lipid Res.* 2004; 45: 9-16.
80. Jong MC, van Ree JH, Dahlmans VEH, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. Reduced very-low-density lipoprotein fractional catabolic rate in apolipoprotein C1-deficient mice. *Biochem J.* 1997; 321: 445-450.
81. van Ree JH, Hofker MH, van der Broek WJ, van Deursen JM, van der Boom H, Frants RR, Wieringa B, Havekes LM. Increased response to cholesterol feeding in apolipoprotein C1-deficient mice. *Biochem J.* 1995; 305: 905-911.
82. Li J, Jiang L, Liu Q. Protective effect of apolipoprotein A I, A II, C I and C II on endothelial cells injury by low density lipoprotein. *Clin Med J.* 1998; 111: 78-81.
83. Kolmakova A, Kwiterovich P, Virgil D, Alaupovic P, Knight-Gibson C, Martin SF, Chatterjee S. Apolipoprotein C-I induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells via recruiting neutral sphingomyelinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 264-269.
84. Holmquist L. Quantitation of human serum very low density apolipoproteins C-I, C-II, C-III and E by enzyme immunoassay. *J Immunol Meth.* 1980; 34: 243-251.
85. Curry MD, McConathy WJ, Fesmire JD, Alaupovic P. Quantitative determination of apolipoproteins C-I and C-II in human plasma by separate electroimmunoassays. *Clin Chem.* 1981; 27: 543-548.
86. Carlson LA, Holmquist L. Concentrations of apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III and E in sera from normal man and their relation to serum lipoprotein levels. *Clin Chem Acta.* 1982; 124: 163-179.
87. Riesen WF, Sturzenegger E. Enzyme-linked immunosorbent assay of apolipoprotein C-I. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1986; 24: 723-727.

88. Bren ND, Rastogi A, Kottke B. Quantification of human plasma apolipoproteins C-I, C-II, and C-III by radioimmunoassays. *Mayo Clin Proc.* 1993; 68: 657-664.
89. Walhberg G, Holmquist L, Walldius G, Annuzzi G. Effects of nicotinic acid on concentrations of serum apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III and E in hyperlipidemic patients. *Acta Med Scand.* 1988; 224: 319-327.
90. Alaupovic P, Fernandes J. The serum apolipoprotein profile of patients with glucose-6-phosphatase deficiency. *Pediatr Res.* 1985; 19: 380-384.
91. Attman PO, Alaupovic P. Lipid and apolipoprotein profiles of uremic dyslipoproteinemia-relation to renal function and dialysis. *Nephron.* 1991; 57:401-410.
92. Alaupovic P, Shaefer EJ, McConathy WJ, Fesmire JD, Brewer HB jr. Plasma apolipoprotein concentrations in familial apolipoprotein A-I and A-II deficiency (Tangier disease). *Metabolism.* 1981; 30: 805-809.
93. Björkegren J, Silveira A, Boquist S, Tang R, Karpe F, Bond MG, Faire E, Hamsten A. Postprandial enrichment of remnant lipoproteins with apoC-I in healthy normolipidemic men with early asymptomatic atherosclerosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1470-1474.
94. Polz E, Kotite L, Havel RJ, Kane JP, Sata T. Human apolipoprotein C-I: concentration in blood serum and lipoproteins. *Biochem Med.* 1980; 24: 229-237.
95. Annuzzi G, Holmquist L, Carlson LA. Concentrations of apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III, E and lipids in serum and serum lipoproteins of normal subjects during alimentary lipaemia. *Scand J Clin Lab Invest.* 1989; 49: 73-81.
96. Björkegren J, Karpe F, Milne RW, Hamsten A. Differences in apolipoprotein and lipid composition between human chylomicron remnants and very low density lipoprotein isolated from fasting and postprandial plasma. *J Lipid Res.* 1998; 39: 1412-1420.
97. Dumon MF, Clerc M. Preliminary report on a case of apolipoproteins C-I and C-II deficiency. *Clin Chim Acta.* 1986; 157: 239-248.

98. Smit M, Kooij-Meijis EVD, Woudt LP, Havekes LM, Frants RR. Exact localization of the familial dysbetalipoproteinemia associated with restriction site in the promoter region of the apoC-I gene. *Biochem Biophys Res Comm.* 1988; 152: 1282-1288.
99. Xu Y, Berglund L, Ramakrishnan R, Mayeux R, Ngai C, Holleran S, Tycko B, Leff T, Shachter NS. A common Hpa I RFLP of apolipoprotein C-I increases gene transcription and exhibits an ethnically distinct pattern of linkage disequilibrium with the alleles of apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 1999; 40: 50-58.
100. Cohn JS, Tremblay M, Boulet L, Jacques H, Davignon J, Roy M, Bernier, L. Plasma concentration and lipoprotein distribution of ApoC-I is dependant on apoE genotype rather than the Hpa I apoC-I promoter polymorphism. *Atherosclerosis.* 2003; 169: 63-70.
101. Drigalenko E, Poduslo S, Elston R. Interaction of the apolipoprotein E and C-I loci in predisposing to late-onset Alzheimer's disease. *Neurology.* 1998; 51: 131-135.
102. Produslo SE, Neal M, Herring K, Shelly J. The apolipoprotein C-I A allele as a risk factor for Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 1998; 23: 361-367.
103. Thrift R, Forte TM, Cahoon BE, Shore VG. Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, HepG2, under defined conditions. *J Lipid Res.* 1986; 27: 236-250.
104. Redgrave TG, Roberts DCK, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem.* 1975; 65: 42-49.
105. Huff MW, Sawyez CG, Connelly PW, Maguire GF, Little JA, Hegele RA. β -VLDL in hepatic lipase deficiency induces apoE-mediated cholesterol ester accumulation in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1993; 13: 1282-1290.
106. Cohn JS, Tremblay M, Amiot M, Bouthillier D, Roy M, Genest J Jr, Davignon J. Plasma concentration of apolipoprotein E in intermediate-

- sized remnant-like lipoproteins in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 149-159.
107. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
 108. Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS. Sterol Resistance in CHO Cells Traced to Point Mutation in SREBP Cleavage-Activating Protein. *Cell.* 1996; 87: 415-426.
 109. Roglans N, Verd JC, Peris C, Alegret M, Vazquez M, Adzet T, Diaz C, Hernandez G, Laguna JC, Sanchez RM. High doses of atorvastatin and simvastatin induce key enzymes involved in VLDL production. *Lipids.* 2002; 37: 445-454.
 110. Wenner C, Lorkowski S, Engel T, Cullen P. Apolipoprotein E in macrophages and hepatocytes is degraded via the proteasomal pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 282: 608-614.
 111. Mazzone T, Pustelnikas L, Reardon CA. Post-translational regulation of macrophage apoprotein E production. *J Biol Chem.* 1992; 267: 1081-1087.
 112. Dory L. Synthesis and secretion of apoE in thioglycolate-elicited mouse peritoneal macrophages: effect of cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 1989; 30: 809-816.
 113. Duan H, Gu D, Mazzone T. Sterols and inhibitors of sterol transport modulate the degradation and secretion of macrophage ApoE: requirement for the C-terminal domain. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1484: 142-150.
 114. Schmitt M, Perret-Grand T. Regulated turnover of a cell surface-associated pool of newly synthesized apolipoprotein E in HepG2 cells. *J Lipid Res.* 1999; 40: 39-49.
 115. Craig WY, Nutik R, Cooper AD. Regulation of apoprotein synthesis and secretion in the human hepatoma Hep G2. The effect of exogenous lipoprotein. *J Biol Chem.* 1988; 263: 13880-13890.

116. Teramoto T, Matsushima T, Kinoshita M, Watanabe T, Hashimoto Y, Tsukamoto K, Katsuragawa K, Okazaki S, Yamanaka M. Effect of chylomicron remnants on apolipoprotein E synthesis in HepG2 cells. *Metabolism*. 1994; 43: 44-50.
117. Shui QY, Olson LM, Reardon CA, Getz GS. Human plasma lipoproteins regulate apolipoprotein E secretion from a post-golgi compartment. *J Biol Chem*. 1992; 267: 21961-21966.
118. Castilho LN, Chamberland A, Boulet L, Davignon J, Cohn JS, Bernier L. Effect of atorvastatin on ApoE and ApoC-I synthesis and secretion by THP-1 macrophages. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003; 42: 251-257.
119. Cohn JS, Tremblay M, Batal R, Jacques H, Veilleux L, Rodriguez C, Barrett PH, Dubreuil D, Roy M, Bernier L, Mamer O, Davignon J. Effect of atorvastatin on plasma apoE metabolism in patients with combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 2002; 43: 1464-1471.
120. Funatsu T, Suzuki K, Goto M, Arai Y, Kakuta H, Tanaka H, Yasuda S, Ida M, Nishijima S, Miyata K. Prolonged inhibition of cholesterol synthesis by atorvastatin inhibits apo B-100 and triglyceride secretion from HepG2 cells. *Atherosclerosis*. 2001; 157: 107-115.
121. Mohammadi A, Macri J, Newton R, Romain T, Dulay D, Adeli K. Effects of atorvastatin on the intracellular stability and secretion of apolipoprotein B in HepG2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18: 783-93.
122. Charpentier D, Tremblay C, Rassart E, Rhainds D, Auger A, Milne RW, Brissette L. Low- and high-density lipoprotein metabolism in HepG2 cells expressing various levels of apolipoprotein E. *Biochemistry*. 2000; 39: 16084-16091.
123. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002; 109: 1125-1131.
124. Dashti N, Williams DL, Alaupovic P. Effects of oleate and insulin on the production rates and cellular mRNA concentrations of apolipoproteins in HepG2 cells. *J Lipid Res*. 1989; 30: 1365-1372.

125. Boren J, Lookene A, Makoveichuk E, Xiang S, Gustafsson M, Liu H, Talmud P, Olivecrona G. Binding of low density lipoproteins to lipoprotein lipase is dependent on lipids but not on apolipoprotein B. *J Biol Chem.* 2001; 276: 26916-26922.
126. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 2003; 423: 762-769.
127. Coleman T, COOH-terminal disruption of lipoprotein lipase in mice is lethal in homozygotes, but heterozygotes have elevated triglycerides and impaired enzyme activity. *J Biol Chem.* 1995; 270: 12518-12525.
128. Weinstock PH, Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2555-2568.
129. Berard AM. High plasma HDL concentration associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesterol acyltransferase. *Nat Med.* 1997; 3: 744-749.
130. Foger B. Cholesterol ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoprotein and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J Biol Chem.* 1999; 274: 36912-36920.
131. Trigatti BI, Krieger M, Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1732-1738.
132. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000; 11: 243-251.
133. Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin Chem Acta.* 1999; 286: 115-143.

134. Yamamoto M, Morita SY, Kumon M, Kawabe M, Nishitsuji K, Saito H, Vertut-Doi A, Nakano M, Handa T. Effects of plasma apolipoproteins on lipoprotein lipase-mediated lipolysis of small and large lipid emulsions. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1632: 31-9.

Appendice

Les résultats présentés dans ce mémoire ont été publiés et présentés oralement lors de plusieurs rencontres scientifiques comme décrit ci-dessous :

Publication

Bouchard C, Dubuc G, Davignon J, Bernier L, Cohn JS. Post-transcriptional regulation of apoC-I synthesis and secretion in human HepG2 cells. *Atherosclerosis*. 2005; 178: 257–264.

Présentations

- 1) **Bouchard C**, Dubuc G, Davignon J, Bernier L, Cohn JS. Régulation post-transcriptionnelle de la production de l'apoC-I par les cellules HepG2. Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme, Ste-Foy, Québec, Avril 2004. Résumé publié dans *Médecine-Sciences* 2004; 20: vii.
 - 2) **Bouchard C**, Dubuc G, Davignon J, Bernier L, Cohn JS. Post-transcriptional regulation of apoC-I production by cholesterol in HepG2 cells. European Atherosclerosis Society, 74th EAS Congress, Séville, Espagne, avril 2004. Résumé publié dans *Atherosclerosis supplements* 2004; 5: 44.
 - 3) **Bouchard C**, Dubuc G, Davignon J, Bernier L, Cohn JS. Post-transcriptional regulation of apoC-I synthesis and secretion by human HepG2 cells. Canadian Lipoprotein Conference, Muskoka, Ontario, octobre 2003.
 - 4) **Bouchard C**, Davignon J, Bernier L, Cohn JS. Effet des lipoprotéines du sérum humain sur la synthèse et la sécrétion de l'apoC-I par les hépatocytes humains. Journée des étudiants gradués, IRCM, Québec, mai 2003.
 - 5) **Bouchard C**, Davignon J, Bernier L, Cohn JS. Effet des lipoprotéines du sérum humain sur la synthèse et la sécrétion de l'apoC-I par les hépatocytes humains. Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme, Ste-Foy, Québec, avril 2003. Résumé publié dans *Médecine-Sciences* 2003; 19: viii.
- Bourse d'excellence M.Sc., Université de Montréal, 2004.
 - Prix meilleure affiche, Canadian Lipoprotein Conference, octobre 2003.
 - Prix meilleure affiche, Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme, avril 2003.

Remerciements

Je tiens à souligner toute ma reconnaissance au Dr. Jean Davignon pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je remercie également le Dr. Jeffrey S. Cohn, mon directeur de mémoire, pour son support constant et ses encouragements. Je voudrais aussi remercier le Dr. Lise Bernier pour ses précieux conseils.

Finalement, je souhaite remercier pour leur aide et leur amitié tous ceux qui ont participé de près ou de loin à cette aventure : Lucie Boulet, Jean-François Carmel, Geneviève Dubuc, Hélène Jacques, Chantal Lefebvre, Chantal Mercure, Claudia Rodriguez, Crina-Cristina Solomon, Lise St-Germain, Carole Tremblay, Michel Tremblay et Hanny Wassef.