

Université de Montréal

Effets d'une surexpression stable de l'apolipoprotéine E  
dans les lignées cellulaires humaines SW872 et HepG2.

Par

Jean-François Carmel  
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 2005

© Jean-François Carmel, 2005



W

4

U58

2006

V. 082

## 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:

Effets d'une surexpression stable de l'apolipoprotéine E  
dans les lignées cellulaires humaines SW872 et HepG2.

Présenté par:

Jean-François Carmel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Grant Mitchell  
Président-rapporteur

Dr Jeffrey Stuart Cohn  
Directeur de recherche

Dre Lise Bernier  
Co-directrice

Dr Benoît Lamarche  
Membre du jury

Mémoire accepté le: \_\_\_\_\_

## Résumé

L'apoE joue un rôle important dans le métabolisme des lipides cellulaires et systémiques. Dans le foie, elle favorise la production et la sécrétion de VLDL, alors que dans le tissu adipeux, son rôle n'est pas bien connu. **Objectifs:** 1) Déterminer le rôle de l'apoE cellulaire dans le métabolisme lipidique des adipocytes. 2) Identifier le rôle de l'apoE cellulaire dans le métabolisme lipidique des hépatocytes – plus particulièrement sur l'incorporation d'acides gras. **Méthodes:** Les cellules SW872 et HepG2 ont été transfectées de façon stable avec l'apoE3. **Résultats:** Une hausse de la croissance cellulaire (division cellulaire accélérée et arrêt de croissance retardé) et une réduction du niveau de triglycérides et de cholestérol a été observée après 15 jours de maturation chez les cellules SW872 surexprimant l'apoE. L'analyse du niveau d'ARNm par PCR en temps réel a également montré une diminution significative de l'expression de PPAR- $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2, SCD1, VLDLR et LDLR.

L'incubation des cellules HepG2 surexprimant l'apoE avec un excès d'oléate a révélé une incorporation réduite d'acides gras qui était accompagnée par une diminution de triglycérides, de phospholipides et de cholestérol cellulaires. Ces cellules sécrétaient également plus de triglycérides que les cellules témoins. **Conclusions:** Les résultats suggèrent qu'une surexpression stable de l'apoE favorise la croissance cellulaire et diminue l'accumulation de lipides dans les cellules SW872, empêchant ainsi une différenciation et une maturation adéquate des adipocytes. De plus, la surexpression de l'apoE engendre une réduction de l'entrée d'acides gras et diminue la synthèse de lipides par les cellules HepG2.

**Mots clés:** apolipoprotéine E, SW872, HepG2, triglycéride, cholestérol, croissance cellulaire, oléate, PPAR- $\gamma$ , différenciation.

**Abstract**

Apolipoprotein E plays a central role in cellular and systemic lipid metabolism. In hepatocytes, apoE promotes VLDL production and secretion but the role of apoE in adipocytes is still unknown. **Aims:** 1) To determine the role of endogenously-synthesized apoE on adipocyte lipid metabolism. 2) To identify the role of endogenously-synthesized apoE on hepatocyte lipid metabolism – particularly fatty acid uptake. **Methods:** SW872 and HepG2 cells were stably transfected with apoE3 before analysing different metabolic parameters. **Results:** ApoE-transfected SW872 cell lines showed an increase in cell growth (cell division was faster, cell cycle arrest was delayed) and a reduced triglyceride and cholesterol accumulation after 15 days of maturation. Also, PPAR- $\gamma$ 1 and  $\gamma$ 2, SCD1, VLDLR and LDLR mRNAs were decreased in these cells.

ApoE-transfected HepG2 cells exposed to oleate showed a diminution of fatty acid uptake that was associated with reduced cellular triglyceride, cholesterol and phospholipid. However, cellular triglyceride secretion was increased in these cells. **Conclusions:** These results suggest that reduced lipid accumulation associated with increased cellular proliferation may alter differentiation and maturation of apoE-transfected SW872 cells. On the other hand, apoE overexpression was associated with a reduction in fatty acid uptake and lipid synthesis in HepG2 cells.

**Key words:** apolipoprotein E, SW872, HepG2, triglyceride, cholesterol, cellular growth, oleate, PPAR- $\gamma$ , differentiation.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
<b>I- Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 L'obésité et ses maladies reliées.....	1
1.2 Le tissu adipeux.....	1
1.3 L'apolipoprotéine E.....	1
1.4 Objectifs et hypothèses.....	2
<b>II- Revue de la littérature.....</b>	<b>3</b>
1. Les lipoprotéines.....	3
1.1 Généralités.....	3
1.2 Métabolisme des chylomicrons.....	4
1.3 Métabolisme des lipoprotéines de très faible densité, de densité intermédiaire et de faible densité.....	5
1.4 Métabolisme des lipoprotéines de haute densité.....	6
2. L'apolipoprotéine E.....	8
2.1 Gène et structure de l'apolipoprotéine E.....	8
2.2 Régulation génique de l'apolipoprotéine E.....	9
2.3 Polymorphisme de l'apolipoprotéine E.....	10
2.4 Impact du polymorphisme sur le métabolisme des lipoprotéines.....	11
2.5 Les maladies reliées au polymorphisme de l'apolipoprotéine E.....	12
2.6 Rôles physiologiques de l'apolipoprotéine E.....	13
2.6.1 L'apolipoprotéine E et le foie.....	13

2.6.2 L'apolipoprotéine E et les macrophages.....	14
2.6.3 L'apolipoprotéine E et les plaquettes.....	15
2.6.4 L'apolipoprotéine E et les lymphocytes T.....	15
2.6.5 L'apolipoprotéine E et le muscle.....	16
2.6.6 L'apolipoprotéine E et le cerveau.....	17
2.6.7 Les autres rôles de l'apolipoprotéine E.....	18
3. Le tissu adipeux et les adipocytes.....	18
3.1 Généralités.....	18
3.2 La différenciation cellulaire et l'adipogénèse.....	19
3.3 Facteurs modulant la différenciation des adipocytes.....	20
3.3.1 Les hormones et les facteurs de croissance.....	20
3.3.2 Les facteurs de transcription.....	21
3.4 L'adipocyte mature.....	24
3.5 Les adipokines.....	25
3.6 Les cellules de liposarcome humain SW872.....	27
<b>III- Article.....</b>	<b>29</b>
1. Abstract.....	30
2. Introduction.....	30
3. Experimental procedure .....	31
3.1 Materials.....	31
3.2 Transfection.....	32
3.3 Cell culture.....	32
3.4 Lipid extraction and assays.....	32
3.5 Protein assays.....	33
3.6 CFDA SE fluorescent dye cell labeling and division assay.....	33
3.7 Flow cytometry analysis.....	33
3.8 mRNA assays.....	33
3.9 Statistical analysis.....	34
4. Results.....	34
5. Discussion.....	37
6. Footnotes.....	42

7. Legends.....	42
8. Table.....	45
9. Figures.....	46
<b>IV- Effets d'une surexpression stable de l'apolipoprotéine E sur la division cellulaire, le métabolisme des lipides et la régulation génique des adipocytes humains.....</b>	<b>51</b>
1. Introduction.....	51
2. Matériel et méthodes.....	51
2.1 Culture cellulaire.....	51
2.2 Transfection.....	52
2.3 Cycle cellulaire.....	52
2.4 Coloration des cellules au Hoechst.....	53
2.5 Extraction et quantification de l'ARN messenger.....	53
2.6 Extraction lipidique.....	53
2.7 Extraction et quantification des protéines.....	54
2.8 Essais avec l'oléate radioactif.....	54
2.9 Analyse statistique.....	55
3. Résultats.....	55
4. Discussion.....	59
<b>V- Effets d'une surexpression stable de l'apolipoprotéine E sur l'incorporation d'acides gras et le métabolisme lipidique des hépatocytes humains.....</b>	<b>64</b>
1. Introduction.....	64
2. Matériel et méthodes.....	65
2.1 Culture cellulaire.....	65
2.2 Transfection.....	65
2.3 Essais avec l'oléate radioactif.....	66
2.4 Extraction des lipides.....	66
2.5 Extraction et quantification des protéines.....	67
2.6 Analyse statistique.....	67
3. Résultats.....	67

4. Discussion.....	73
<b>VI- Discussion et conclusions.....</b>	<b>77</b>
<b>VII- Références.....</b>	<b>85</b>
Annexe.....	xiii
Curriculum Vitae.....	xiv

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I. Effect of apoE overexpression on adipocyte gene expression .....	45
Tableau II. Effet d'une surexpression stable de l'apoE sur les niveaux d'ARNm LDLR et VLDLR.....	59

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Vue globale du métabolisme des lipoprotéines chez l'humain.....	4
Figure 2.	L'apolipoprotéine E: une molécule pléiotrope.....	14
Figure 3.	Le développement des adipocytes.....	19
Figure 4.	Cellular and secreted apoE in transfected and non-transfected SW872 cells.....	46
Figure 5.	Endogenously synthesized apoE promotes cell growth and reduces lipid accumulation in SW872 cells cultured with lipoproteins.....	47
Figure 6.	Endogenously synthesized apoE promotes cell growth and reduces lipid accumulation in SW872 cells cultured in absence of lipoproteins.....	48
Figure 7.	Exogenous apoE has no effect on cell growth and lipid accumulation in SW872 cells.....	49
Figure 8.	Endogenously synthesized apoE increases cell division kinetics in SW872 cells.....	50
Figure 9.	Endogenously synthesized apoE downregulates PPAR- $\gamma$ 1 and $\gamma$ 2 mRNA.....	50
Figure 10.	Arrêt de croissance retardée chez les surexprimants apoE lors de la maturation des cellules SW872.....	56
Figure 11.	Effet d'une supplémentation en acides gras sur le métabolisme lipidique des cellules SW872 surexprimant l'apoE.....	57
Figure 12.	Diminution de la synthèse lipidique chez les cellules HepG2 surexprimant l'apoE .....	69
Figure 13.	Incorporation d'acides gras réduite chez les cellules HepG2 surexprimant l'apoE.....	71
Figure 14.	Réduction du contenu lipidique et hausse de la sécrétion de triglycérides chez les cellules HepG2 surexprimant l'apoE.....	72
Figure 15.	Effets globaux d'une surexpression de l'apolipoprotéine E sur l'incorporation d'acides gras et le métabolisme lipidique des cellules HepG2.....	73

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCA1	<i>Adenosine triphosphate-binding cassette transporter 1</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Apo	Apolipoprotéine
ApoER2	Récepteur-2 d'apoE
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASP	Protéine stimulant acylation
CEBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CETP	Protéine de transfert de cholestérol estérifié
CD36	<i>scavenger receptor</i>
DEX	Dexaméthasone
DMEM	<i>Dulcecco's Modified Eagle's Medium</i>
EGF	Facteur de croissance épidermal
FBS	Sérum bovin foetal
GH	Hormone de croissance
GPDH	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
HCR	Régions de contrôle hépatique
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HL	Lipase hépatique
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i>
IBMX	Isobuthylméthylxanthine
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor-I</i>
IL-2	Interleukine-2
IMC	Indice de masse corporelle
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
INSR	Récepteur de l'insuline
LCAT	<i>Lecithin cholesterol acyl transferase</i>
LDL	Lipoprotéine de faible densité

LDLR	Récepteur LDL
LPDS	Sérum déficient en lipoprotéines
LPL	Lipase des lipoprotéines
LRP	Protéine apparentée au LDLR
LXR	<i>Liver X-activated receptor</i>
ME	<i>Multienhancer</i>
MTP	Protéine de transfert microsomal
NEFA	Acides gras non estérifiés
NO	Oxyde nitrique
OxLDL	LDL oxydées
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PKA	Protéine kinase A
PLTP	Protéine de transfert des phospholipides
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
RAP	Protéine associée au récepteur
RXR	<i>Retinoic acid receptor</i>
SCD1	<i>Stearoyl-CoA desaturase 1</i>
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
TGF	<i>Transforming growth factor bêta</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité
VLDLR	Récepteur VLDL

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier profondément Dr Jean Davignon de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche, de m'avoir fait partager ses expériences professionnelles et de m'avoir appris le mot pléiotrope. Je tiens également à remercier Dr Jeffrey Cohn, Dre Lise Bernier et ma fiancée Marie-Claude (une future chercheuse exceptionnelle!) pour leur support moral et leurs précieux conseils au cours de ma maîtrise.

Je remercie également tous les membres du laboratoire pour leurs encouragements et leur aide: Lucie Boulet, Catherine Bouchard, Geneviève Dubuc, Hélène Jacques, Claudia Rodriguez, Crina-Cristina Solomon, Lise St-Germain, Carole Tremblay, Michel Tremblay et Hanny Wassef.

Finalement, j'aimerais remercier Dr Grant Mitchell et Dr Benoît Lamarque d'avoir gentiment accepté d'examiner mes travaux effectués durant ma maîtrise.

## **1. INTRODUCTION**

### **1.1 L'obésité et les maladies qui lui sont reliées**

L'obésité est omniprésente dans les pays industrialisés où règnent la restauration rapide et un style de vie davantage sédentaire (1;2). Elle est la conséquence, en majeure partie, d'un déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétique. L'obésité est une maladie dont la prévalence augmente énormément à chaque année.

Elle est associée à plusieurs maladies dont le diabète non-insulino dépendant, l'hypertension, le cancer et l'athérosclérose (3;4). Le tissu adipeux, dont un des rôles est d'entreposer les lipides circulants sous forme principalement de triglycérides, est le joueur clé intervenant dans le processus menant à l'obésité.

Depuis quelques années, les compagnies pharmaceutiques tentent de trouver la pilule miracle qui pourrait contrer l'obésité. La compagnie Sanofi-Aventis, par exemple, désire effectuer sous peu la mise en marché de son médicament accompia (rimonabant) qui permet la perte de poids (5).

### **1.2 Le tissu adipeux**

Le tissu adipeux, en plus d'être un réservoir de lipides, est maintenant considéré comme un organe endocrinien, puisqu'il produit plusieurs facteurs ayant des effets sur différents tissus du corps humain. Ces facteurs contribuent, entre autres, au développement ou à l'amélioration de la résistance à l'insuline, des dyslipidémies, des dysfonctions vasculaires de l'inflammation chronique et de l'état prothrombotique (6). Plusieurs équipes de recherche étudient et tentent de comprendre le fonctionnement du tissu adipeux et sa relation avec les autres organes du corps humain.

### **1.3 L'apolipoprotéine E**

L'apolipoprotéine (apo) E est une protéine plasmatique qui se retrouve à la surface de la plupart des lipoprotéines. Elle permet le recyclage des lipoprotéines vers le foie et les tissus périphériques en agissant comme

ligand pour différents récepteurs. Outre son rôle dans la distribution corporelle des lipides, elle favorise la production de VLDL hépatiques, l'extension des neurones, l'activation d'enzymes du métabolisme des lipoprotéines et l'oxydation des lipides, tandis qu'elle inhibe l'aggrégation plaquettaire et la prolifération des lymphocytes T et des cellules du muscle lisse (chap. II, section 2.6).

Le foie représente le site majeur de production de l'apoE. Dans ce tissu, l'apoE participe à la synthèse et à la sécrétion des VLDL (7;8). L'apoE est retrouvée également dans le tissu adipeux (9-13), mais son rôle dans ce tissu est encore peu connu.

Il a été démontré que les niveaux d'ARNm et de protéine apoE étaient augmentés lors de la différenciation des adipocytes (13;14). Ces résultats suggèrent une implication de l'apoE cellulaire au niveau de la différenciation ou encore une régulation de la production de l'apoE par l'accumulation de lipides associée au processus de différenciation. Les travaux de Chiba et al. ont montré que l'apoE, par l'intermédiaire des VLDL, était nécessaire pour induire la différenciation des adipocytes (15). En effet, des souris *ob/ob*; *apoE<sup>-/-</sup>* ne montraient aucun gain de poids ni d'augmentation de la quantité de tissu adipeux lorsque exposées à une diète riche en gras et en cholestérol. Par ailleurs, une autre étude a démontré que les souris *apoE<sup>-/-</sup>* étaient résistantes à l'obésité et à l'athérosclérose (15;16). L'ensemble de ces travaux suggère une implication de l'apoE dans l'étiologie de l'obésité.

#### **1.4 Objectifs et hypothèses**

Sachant que le rôle de l'apoE dans le tissu adipeux n'est pas bien connu, nous avons procédé à la surexpression stable de l'apoE dans les cellules de liposarcome humain SW872, un bon modèle d'adipocytes, afin d'étudier le métabolisme des lipides. Notre hypothèse était que l'apoE pourrait favoriser l'accumulation de lipides dans les adipocytes et faciliter la différenciation et la maturation cellulaires.

Dans le foie, l'apoE participe à la production et à la sécrétion de VLDL. Afin de tenter d'identifier le rôle précis de l'apoE dans ce processus, les cellules humaines HepG2, un modèle représentatif des hépatocytes, ont été transfectées de façon stable avec l'apoE. Notre hypothèse était que les cellules HepG2 surexprimant l'apoE pourraient faciliter l'entrée d'acides gras et permettre une augmentation de la synthèse des lipides intracellulaires, ce qui favoriserait une hausse de la synthèse et de la sécrétion de VLDL.

## II. Revue de la littérature

### 1. Les lipoprotéines

#### 1.1 Généralités

Les lipides tels que le cholestérol libre ou estérifié, les phospholipides et les triglycérides jouent un rôle essentiel dans l'intégrité structurale des cellules, le transport vésiculaire et comme source d'énergie. Le transport de ces lipides requiert des particules appelées lipoprotéines. Le cœur de ces lipoprotéines est composé de triglycérides et de cholestérol estérifié, alors que leur surface est constituée de cholestérol libre, de phospholipides et d'apolipoprotéines. Les apolipoprotéines lient les lipides et assurent leur solubilisation dans l'environnement aqueux comme le sang. Elles permettent l'activation ou l'inhibition d'enzymes clés du métabolisme des lipides, servent de système de transport, assurent la stabilité structurale des lipoprotéines ou servent de ligands (17). Une des apolipoprotéines les mieux caractérisées est sans contredit l'apoE. Elle se retrouve sur la surface des chylomicrons, des lipoprotéines de très faible densité (VLDL), des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et des lipoprotéines de haute densité (HDL) et elle favorise la clairance de ces lipoprotéines en agissant comme ligand pour le récepteur LDL (LDLR), la protéine apparentée au récepteur LDL (LRP), le récepteur VLDL (VLDLR) et pour les *heparan sulfate proteoglycans* (HSPG) (18-20).

## 1.2 Métabolisme des chylomicrons

Le métabolisme des lipides peut être regroupé en deux volets: la voie exogène qui est importante pour le transport des lipides en provenance de l'intestin après la prise de nourriture et la voie endogène qui joue un rôle clé dans le transport des lipides synthétisés par le foie. La voie exogène débute par l'absorption des matières grasses par la membrane apicale des entérocytes. Ces cellules engendrent la formation de lipoprotéines appelées chylomicrons. L'apoB-48 qui est essentielle à la formation des chylomicrons est combinée aux lipides (~90% de triglycérides) par le biais de la protéine de transfert microsomal (MTP), ce qui permet la sécrétion des chylomicrons du côté basolatéral de la cellule (17;21). Les chylomicrons empruntent la circulation lymphatique et entrent dans la circulation veineuse au niveau du conduit thoracique (22). Lors du passage des chylomicrons dans les capillaires avoisinant le tissu adipeux et les muscles, la lipase des lipoprotéines (LPL), qui est associée aux cellules endothéliales, hydrolyse les triglycérides présents dans les chylomicrons (23). Les glycérols et les acides gras résultant de la réaction enzymatique sont dès lors captés par le muscle, le foie et le tissu adipeux. Le diamètre des chylomicrons rétrécit et la composition de la lipoprotéine est alors modifiée. Le cholestérol libre, les phospholipides, l'apoA-I et l'apoA-II sont transférés aux HDL naissantes en échange de l'apoE, l'apoC-I, l'apoC-II et l'apoC-III, ce qui permet la formation des résidus de chylomicrons qui seront captés par le foie via le LDLR et la LRP (24).

L'apoE, qui se lie fortement aux HSPG, de même que l'apoC-II, qui permet l'activation de la LPL, sont essentielles pour l'ancrage des chylomicrons sur les HSPG à proximité de la LPL afin de maximiser la lipolyse. L'apoC-I et l'apoC-III empêchent le bon fonctionnement de la lipolyse soit en déplaçant l'apoE ou bien en obstruant les composantes de liaison à la LPL (25) (Fig. 1).

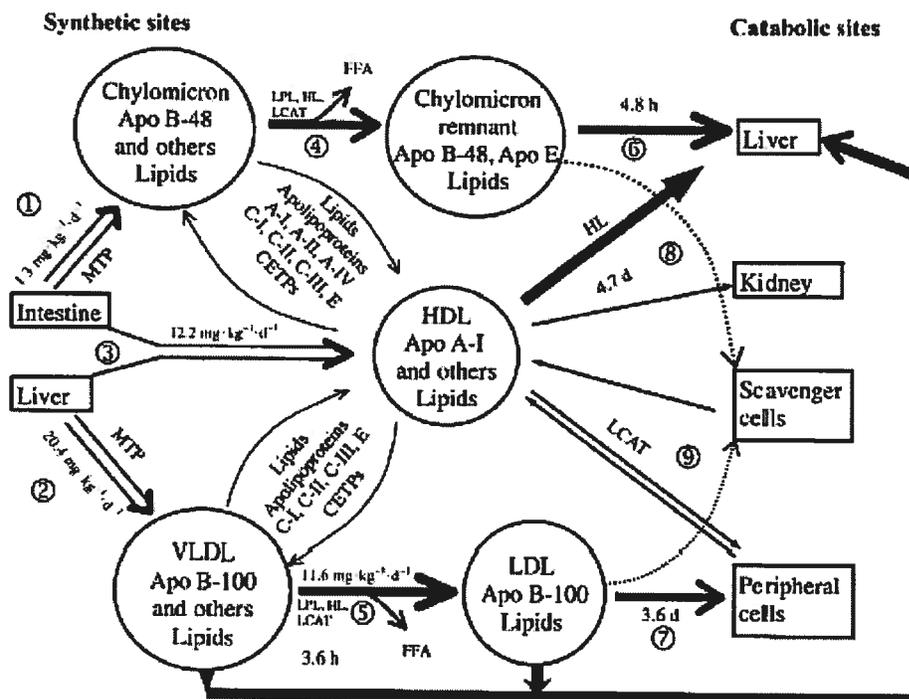


Figure 1. Vue globale du métabolisme des lipoprotéines chez l'humain. (détails: section 1) (21).

### 1.3 Métabolisme des lipoprotéines de très faible densité, de densité intermédiaire et de faible densité

La voie endogène du métabolisme des lipides est grandement stimulée par la prise de nourriture (état postprandial) (26). Plus de 80% des particules circulantes dans l'état postprandial correspondent aux VLDL. L'apoB-100 représente la protéine majoritaire des VLDL. Dans le foie, elle se combine à d'autres lipides (~60% de triglycérides) par l'entremise de la MTP avant d'être sécrétée sous forme de VLDL. De façon similaire aux chylomicrons, les VLDL transfèrent du cholestérol libre, des phospholipides, l'apoC-I, l'apoC-II, l'apoC-III et l'apoE aux HDL naissantes. Les VLDL sont également la cible de la LPL. Les triglycérides sont hydrolysés et le pourcentage en cholestérol estérifié augmente faisant en sorte que la

particule devient plus petite et plus dense. Ces particules se nomment  $\beta$ -VLDL (ou IDL).

Près de 50% des IDL sont captées par le foie par un mécanisme pratiquement identique à la capture des résidus de chylomicrons (17). La lipase hépatique (HL) qui hydrolyse les phospholipides et les triglycérides a une forte affinité pour les IDL, et des études ont montré une interaction entre la HL et la LRP dans la capture de ces lipoprotéines vers les hépatocytes (27;28). Suite à la lipolyse, les IDL deviennent des LDL.

Les LDL constituent la plus grande classe de lipoprotéines transportant le cholestérol. L'apoB-100 représente la principale apolipoprotéine des LDL, mais on y retrouve également parfois l'apoE et l'apoC-III (29). Les LDL contiennent du cholestérol estérifié (~40%), des phospholipides (~25%) et des triglycérides (~10%). Avant d'interagir avec les récepteurs du foie et des tissus périphériques à des fins de clairance, les LDL subissent quelques transformations à l'aide de la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP). La CETP assure le transfert du cholestérol estérifié et des triglycérides entre les lipoprotéines. De cette façon, les VLDL transfèrent leurs triglycérides vers les LDL et les HDL en retour du cholestérol estérifié (30). Cette action permet de réduire le ratio lipides/protéines des LDL, ce qui les rend plus athérogéniques que les particules LDL plus volumineuses (31) (Fig.1).

#### **1.4 Métabolisme des lipoprotéines de haute densité**

Le foie est le site principal de la synthèse des HDL naissantes. En collaboration avec les tissus périphériques, le foie permet la lipidation des HDL naissantes à l'aide des phospholipides et du cholestérol (32). Les HDL jouent un rôle primordial dans le transport inverse du cholestérol. Le foie sécrète d'abord une forme naissante de HDL appelée HDL pré- $\beta$  discoïdale. Elles transportent surtout l'apoA-I (près de 90% de la masse protéique des HDL). L'apoA-I est essentielle aux HDL, puisqu'en son absence, il n'y a pas

de HDL dans le plasma sanguin (33). L'*adenosine triphosphate-binding cassette transporter 1* (ABCA1) provenant des tissus périphériques (macrophages, tissu adipeux) transfère du cholestérol et des phospholipides jusqu'aux HDL pré- $\beta$ . Le cholestérol libre à la surface des HDL pré- $\beta$  est alors estérifié à l'aide de l'enzyme *lecithin cholesterol acyl transferase* (LCAT) située à la surface des HDL, faisant en sorte que les HDL pré- $\beta$  adoptent une forme sphérique plutôt que discoïdale.

Ces particules deviennent donc des HDL<sub>3</sub>, puis des HDL<sub>2</sub> à mesure qu'elles acceptent du cholestérol libre des cellules qui est ensuite transformé en cholestérol estérifié par la LCAT (32). À l'exception du cholestérol libre servant à la lipodation des HDL pré- $\beta$ , le cholestérol libre transféré aux HDL<sub>3</sub> est médié par le *scavenger receptor class B type 1* (SR-BI) ou par diffusion passive, par un mécanisme distinct de l'ABCA1 (34). Les HDL<sub>2</sub> matures contiennent plusieurs apolipoprotéines (E, C-I, C-II, C-III) qui serviront d'échange avec les autres lipoprotéines. Elles échangent également leur cholestérol et leurs triglycérides avec les LDL et les VLDL à l'aide de la CETP, tandis que les HDL<sub>3</sub> acceptent le cholestérol libre et les phospholipides grâce à l'hydrolyse des VLDL par la LPL et la protéine de transfert des phospholipides (PLTP). Les HDL<sub>2</sub> peuvent également subir une lipolyse par la HL et redevenir des HDL<sub>3</sub> permettant d'acquérir d'autre cholestérol tissulaire (35). La dégradation des HDL<sub>2</sub> et des HDL<sub>3</sub> se fait au niveau du foie via l'interaction avec le SR-B1 qui permet l'extraction du cholestérol estérifié, permettant la conversion des HDL riches en lipides en des HDL naissantes. Le cholestérol estérifié est finalement transformé en acides biliaires qui seront ultérieurement sécrétés dans le système digestif (Fig.1).

Le métabolisme des lipides est un processus complexe qui nécessite la coopération de plusieurs tissus pour la répartition adéquate des lipides endogènes et exogènes dans l'organisme. L'apoE étant exprimée dans la plupart de ces tissus, elle joue un rôle crucial dans ce processus. Des

changements au niveau de la régulation génique de l'apoE et le polymorphisme de l'apoE influencent grandement le métabolisme des lipides et peuvent parfois être la cause de certaines pathologies humaines.

## 2. L'apolipoprotéine E

### 2.1 Gène et structure de l'apolipoprotéine E

L'apoE est majoritairement synthétisée et sécrétée par le foie, mais est également retrouvée dans plusieurs tissus incluant: le tissu adipeux, le muscle, la rate, les poumons, les reins, les ovaires, le cerveau, la peau, les macrophages et les glandes surrénales (9-13). Le gène *APOE* est localisé sur le chromosome 19 à l'extrémité 5' d'un *cluster* génique de 44 kb incluant les gènes de l'apoC-I, apoC-IV, apoC-II et le pseudogène de l'apoC-I (36-38). Il est constitué de quatre exons et de trois introns pour une longueur de 3597 nucléotides (39).

L'apoE a initialement été décrite comme étant la protéine riche en arginine par Shore et Shore en 1973 (40). Quelques années plus tard, apoE devenait l'appellation couramment utilisée dans la communauté scientifique. La structure primaire (41) et la séquence complète en acides aminés (39) de l'apoE ont été rapportées respectivement en 1974 et 1982. Il s'agit d'une protéine de 317 acides aminés comportant un peptide signal de 18 acides aminés. L'apoE mature est composée de 299 acides aminés et son poids moléculaire est de 34,2 kDa (39). En bref, l'excision du peptide signal permet à l'apoE de subir des étapes de maturation. Elle est dirigée vers l'appareil de Golgi afin de subir des modifications post-traductionnelles (glycosylation). Il s'agit d'une addition de chaînes d'hydrates de carbone contenant l'acide sialique (42). L'apoE cellulaire mature demeure ensuite dans les vésicules et les citernes de l'appareil de Golgi (43-46), emprunte la voie de dégradation (47;48), se localise dans le noyau (49) ou est sécrétée et est intégrée aux chylomicrons, IDL, VLDL et aux HDL dans le plasma sanguin (18-20). Il a été également démontré qu'une proportion de l'apoE

sécrétée reste liée aux protéoglycans à la surface des cellules (50-54). L'apoE est constituée d'hélices  $\alpha$  (62%), de feuillets  $\beta$  (9%), de coudes  $\beta$  (11%) et de structures aléatoires (18%) (46). Elle possède un domaine amino-terminal (résidus 1-191) de 22 kDa, ainsi qu'un domaine carboxy-terminal (résidus 216-299) (55). Plus spécifiquement, une région riche en arginine et en lysine (résidus 136-150) permettrait l'interaction de l'apoE avec les HSPG, le LDLR et la LRP (20;56;57). La partie carboxy-terminale de l'apoE servirait plutôt à la liaison aux lipides et aux lipoprotéines (39). La caractérisation de la structure de l'apoE a permis de suggérer l'existence de plusieurs conformations probables de l'apoE en solution. Elle pourrait se trouver sous forme d'oligomère, de tétramère ouvert ou fermé ou de monomère natif, partiellement dénaturé ou totalement dénaturé (58). Cette association pourrait être causée par ses cinq régions hélicoïdales amphipathiques (acides aminées: 60-78, 130-150, 203-221, 226-243 et 245-266) (39).

## 2.2 Régulation génique de l'apolipoprotéine E

La transcription du gène *APOE* dans les hépatocytes est sous le contrôle de deux séquences régulatrices; les régions de contrôle hépatique (HCR) 1 et 2, lesquelles sont situées à 15 kb (HCR.1) et à 26 kb (HCR.2) en 3' de la région codante (59;60). La région HCR. 1 coordonne l'expression de l'apoE et de l'apoC-I, alors que la région HCR.2 régule plutôt l'apoC-II et l'apoC-IV. Au niveau des macrophages et du tissu adipeux, Shih et al. ont montré l'existence de deux régions amplificatrices régulant la transcription de l'apoE. Il s'agit d'une séquence *multienhancer 1* (ME.1) de 620 nucléotides, localisée à 3,3 kb en aval du gène de l'apoE et d'une séquence *multienhancer 2* (ME.2) de 619 nucléotides, se retrouvant à 15,9 kb en amont du gène de l'apoE et à 5,9 kb en aval du gène de l'apoC-I (38).

Il existe plusieurs régulateurs de la transcription du gène de l'apoE. Il a été démontré que l'interféron  $\gamma$  (61), l'interleukine I (62) et les lipopolysaccharides bactériens (63) inhibaient la transcription de l'apoE, alors

que le *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) (64) et le *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ) (65) l'activaient dans les macrophages. Des essais de transfection utilisant un promoteur fusionné à un gène rapporteur, des essais *in vivo* d'empreintes à la DNase I et des essais simple hybride ont permis l'identification de plusieurs facteurs de transcription qui interagissent avec la région proximale du promoteur du gène apoE (SP1, HNF-3, TF-LF2, GATA-1, CEBP, BEF-1, Aa, B1b, B2b, Zic1, et Zic2) (66). La transcription de l'apoE dans les adipocytes et les macrophages est également régulée par la présence d'oxystérols. Le liver X-activated receptor (LXR) est un récepteur nucléaire qui forme un hétérodimère avec le retinoic acid receptor (RXR) après la liaison de son ligand (oxystérol). Il peut ensuite lier son élément de réponse (LXRE) au niveau des régions ME.1 et ME.2 dans le promoteur du gène de l'apoE afin d'induire sa transcription (67). Quelques motifs reconnus par le récepteur aux glucocorticoïdes et par la *CCAAT/enhancer binding protein-alpha* et *bêta* (CEBP- $\alpha$  et  $\beta$ ) sont retrouvés également dans les régions ME.1 et ME.2 (38), alors qu'un élément de réponse au *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (PPAR- $\gamma$ ) est localisé dans la région intergénique entre l'apoE et l'apoC-I (68). La présence de polymorphisme dans le promoteur du gène de l'apoE influence également sa transcription en affectant la liaison des facteurs de transcription au niveau du promoteur. Une étude à partir d'une population européenne a permis d'établir la corrélation entre le polymorphisme -219G/T et les différents niveaux d'apoE dans le plasma sanguin. L'allèle -219T était associée avec une hausse de l'incidence du risque d'infarctus du myocarde et de maladies coronariennes prématurées (69;70).

### **2.3 Polymorphisme de l'apolipoprotéine E**

Il existe du polymorphisme également au sein de la partie codante du gène *APOE*. Celui-ci code pour trois allèles soient  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 et  $\epsilon$ 4, résultant en trois isoformes protéiques désignés apoE2, apoE3 et apoE4. Ces isoformes diffèrent selon la séquence en acides aminés en position 112 et 158.

L'apoE2 possède une cystéine en position 112 et 158. L'apoE3 contient une cystéine en position 112 et une arginine en position 158, alors que l'apoE4 possède une arginine en position 112 et 158 (71). En tout, six génotypes sont possibles: E3/E3 (le plus fréquent), E4/E3, E3/E2, E4/E4, E4/E2, et E2/E2 (le moins fréquent) (72).

Il existe également un polymorphisme déterminé non génétiquement qui est relié aux divers degrés de sialisation lors des modifications post-traductionnelles de l'apoE. Ces types d'isoformes comptent pour environ 10% à 20% de l'apoE plasmatique (73).

#### **2.4 Impact du polymorphisme sur le métabolisme des lipoprotéines**

Le polymorphisme a un effet important sur la production d'apoE. Les individus porteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  possèdent de hautes concentrations d'apoE, alors que l'allèle  $\epsilon 4$  est associé avec une faible concentration d'apoE (74;75). Pour les sujets porteurs des deux allèles  $\epsilon 3$ , 50% des VLDL<sub>2</sub> sont convertis en LDL, tandis que l'autre 50% est directement catabolisé. En ce qui concerne les sujets apoE4/E4, 70% des VLDL<sub>2</sub> sont transformés en LDL et le taux catabolique fractionnel des VLDL, IDL, et LDL est plus bas que pour les détenteurs du phénotype apoE3/E3. Les sujets apoE2/E2 quant à eux, produisent moins de VLDL<sub>1</sub>, mais les convertissent davantage en VLDL<sub>2</sub> (76). Le polymorphisme affecte également la liaison de l'apoE avec ses différents récepteurs à la surface des cellules. L'apoE2 a une force de liaison équivalente à 2% de celle de l'apoE3 et de l'apoE4 (75). Par conséquent, les individus détenteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  sont beaucoup moins efficaces dans la clairance des résidus de chylomicrons et des VLDL du plasma sanguin vers le foie après la prise d'un repas gras (77). En général, les personnes apoE2 ont un taux élevé en triglycérides et un niveau réduit en apoB et en cholestérol. À l'opposé, l'apoE4 est associée avec un faible taux de triglycérides et un niveau élevé d'apoB et de cholestérol, alors que l'apoE3 se situe entre les deux (78).

## 2.5 Les maladies reliées au polymorphisme de l'apolipoprotéines E

Il a été démontré qu'une dyslipidémie rare ( $\sim 1: 10\ 000$ ) pouvait survenir lorsqu'un individu était homozygote pour l'allèle  $\epsilon 2$ . Il s'agit de la dysbêtalipoprotéïnémie de type III (type III). Cette maladie démontre une accumulation de triglycérides, de cholestérol et de lipoprotéines anormales désignées  $\beta$ -VLDL. Ces dernières sont enrichies en apoE et en cholestérol et proviennent de l'intestin et du foie. La maladie se manifeste par l'apparition de xanthes plans palmaires et tubéroéruptifs caractéristiques et de l'athérosclérose (79). D'autres facteurs (régime alimentaire, obésité, hypothyroïdie, déficience en œstrogènes, autres gènes causant une hyperlipidémie) sont par contre nécessaires afin que la maladie se révèle (78;80).

De nos jours, diverses équipes de recherche tentent d'élucider certaines maladies dégénératives dont le Parkinson et l'Alzheimer. Corder et al. ont été les premiers à identifier l'apoE4, comme étant un facteur de risque majeur pour la maladie d'Alzheimer (81). L'apoE4 permet l'augmentation de la production et du dépôt de  $\beta$ -amyloïde qui joue un rôle central dans la pathogénèse (82;83). La maladie se manifeste par des troubles progressifs et des pertes irréversibles des fonctions cognitives. L'allèle  $\epsilon 4$  a aussi été associé à un accroissement de la formation des calculs biliaires (84) et une réduction de l'incidence d'adénome proximal du colon (85). Une méta-analyse de 48 études publiées comprenant environ 50 000 patients a montré que le génotype  $\epsilon 4/\epsilon 4$  avait 42% plus de risque d'avoir une maladie coronarienne que le génotype  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , tandis que l'allèle  $\epsilon 2$  n'avait pas d'association significative (86). Finalement, il est à noter que le polymorphisme de l'apoE est un facteur de risque dans plusieurs autres pathophysiologies incluant le diabète, la maladie rénale, les accidents cérébrovasculaires, la schizophrénie et le cancer (19;72;86-89).

## 2.6 Rôles physiologiques de l'apolipoprotéine E

Les modèles animaux ont été un atout essentiel à la compréhension du rôle de l'apoE dans le système cardiovasculaire. L'élaboration de souris déficientes en apoE (apoE<sup>-/-</sup>), de même que les souris transgéniques ont permis de constater les propriétés anti-athérogéniques de l'apoE, ainsi que son rôle extrêmement important dans la clairance des lipoprotéines. En effet, les souris apoE<sup>-/-</sup> sont sévèrement hypercholestérolémiques et développent l'athérosclérose de manière sévère, spontanée et prématurée (90) et une diète riche en cholestérol accentue cet effet. Le fait d'augmenter le niveau d'apoE circulant dans les souris apoE<sup>-/-</sup> est d'ailleurs suffisant pour faire régresser l'athérosclérose de ces animaux [66-69], alors que la présence d'un seul allèle d'apoE (+/-) permet de prévenir les hyperlipidémies suite à la prise d'une diète normale ou riche en matières grasses (91). Chez les humains déficients en apoE (E0/0), on retrouve le même type d'hyperlipidémie que chez les souris apoE<sup>-/-</sup>, c'est-à-dire une hausse accrue du cholestérol, de VLDL-cholestérol, de triglycérides et de LDL-cholestérol (92). La section ci-dessous, ainsi que la figure 2 illustrent l'importance des différents rôles physiologiques de l'apoE au sein de l'organisme.

### 2.6.1 L'apolipoprotéine E et le foie

Le foie étant une source abondante d'apoE, plusieurs équipes de recherche se sont penchées sur son rôle dans ce tissu. L'observation que les souris apoE<sup>-/-</sup> nourries avec une diète faible en gras accumulent des triglycérides hépatiques et produisent moins de VLDL a permis de suggérer un rôle possible de l'apoE endogène au niveau de la régulation de la production de VLDL hépatiques (93;94). Mensenkamp et al. ont donc fait un croisement génétique entre des souris apoE<sup>-/-</sup> et des souris transgéniques APOE3 afin d'obtenir des souris APOE3/apoE<sup>-/-</sup>. Ils ont ainsi montré une hausse de la production *in vivo* de VLDL-triglycérides (VLDL-TG) avec l'introduction du transgène APOE3, ce qui indique un rôle de l'apoE dans la

sécrétion de VLDL-triglycérides hépatiques et ce, indépendamment de son rôle dans la clairance des lipoprotéines (8). Ces expériences ne démontrent cependant pas si l'apoE accroît la quantité de triglycérides dans les VLDL ou a plutôt un impact sur le nombre de particules VLDL sécrétées. Pour ce faire, l'équipe du Dr Rader s'est intéressée à la sécrétion des particules VLDL-apoB qui est un indicateur du niveau de sécrétion des VLDL hépatiques, puisqu'une molécule d'apoB est sécrétée par particule de VLDL. Ils ont étudié l'effet de l'apoE sur la production de VLDL-apoB à partir de souris déficientes en apoE et des souris surexprimant l'apoE. En comparaison avec les souris témoins, ils ont observé une réduction de 33% de la production de VLDL-apoB dans les souris apoE<sup>-/-</sup>, tandis qu'une hausse de 48% de la production de VLDL-apoB était observée chez les souris surexprimant l'apoE (7).

### **2.6.2 L'apolipoprotéine E et les macrophages**

Dans les macrophages, l'apoE module le métabolisme du cholestérol cellulaire en médiant son efflux vers le foie à des fins de dégradation par la voie biliaire (95;96). Le mécanisme de cet effet n'a pas été clairement identifié. Il a été suggéré que l'apoE endogène se joindrait à la membrane plasmique et interagissait avec les protéoglycans (97) afin de faciliter la sortie du cholestérol via le transporteur ABCA1 ou SR-BI, puis transférer le cholestérol aux HDL<sub>3</sub> (98-100). Bien que l'apoE exogène favorise l'efflux du cholestérol, l'apoE endogène est beaucoup plus apte à promouvoir cet effet (100;101). Dans plusieurs études, il a été démontré qu'une faible expression de l'apoE dans les souris déficientes en apoE permet la régression de l'athérosclérose sans toutefois modifier le profil lipidique (102-106). On peut donc concevoir que l'apoE possède d'autres propriétés anti-athérogéniques indépendamment de son rôle au niveau du métabolisme des lipides.

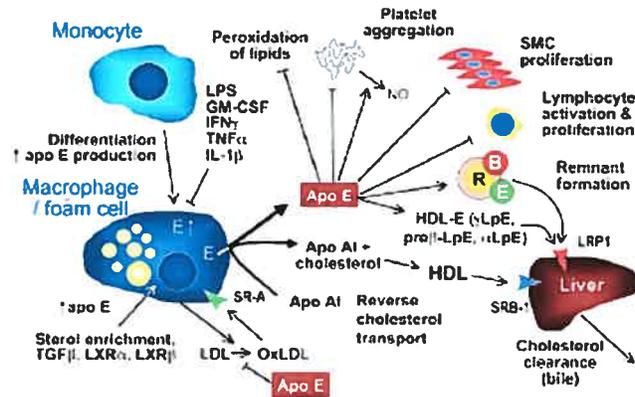


Figure 2. **L'apolipoprotéine E: une molécule pléiotrope.** L'apoE est synthétisée et sécrétée par plusieurs tissus et exerce plusieurs rôles physiologiques dans l'organisme. (section 2.6) (107).

### 2.6.3 L'apolipoprotéine E et les plaquettes

L'apoE offre une protection contre les maladies vasculaires en inhibant l'aggrégation plaquettaire induite par des agonistes (épinéphrine, collagène et ADP) (108). Quelques investigateurs ont observé que les lipoprotéines riches en apoE comme les HDL et les VLDL étaient très efficaces quant à l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire (108-110;110;111). Riddell et al. ont trouvé un mécanisme pouvant expliquer l'action de l'apoE au niveau des plaquettes. Ils ont montré que l'apoE se liait à des récepteurs spécifiques comme le récepteur-2 apoE (apoER2) à la surface des plaquettes et induisait la synthèse d'oxyde nitrique (NO), ce qui permettait d'inhiber l'aggrégation des plaquettes (108;111). D'un autre côté, la protéine associée au récepteur (RAP) qui régule l'activité du récepteur LDL, empêcherait l'apoE de lier les plaquettes et réduirait l'effet anti-aggrégatoire de l'apoE (111).

### 2.6.4 L'apolipoprotéine E et les lymphocytes T

L'apoE joue également un rôle important dans l'immunorégulation en supprimant la prolifération des lymphocytes T (112). Bien que l'apoE liée aux lipoprotéines soit plus efficace, l'apoE libre serait aussi un inhibiteur potentiel de la prolifération lymphocytaire (113). Kelly et al. ont démontré que l'apoE inhibait la prolifération des cellules T (CD4 et CD8) en partie en réduisant

l'activité de l'interleukine-2 (IL-2) (112). Par conséquent, les cellules arrêtaient de croître et restaient en phase  $G_1$  du cycle cellulaire (114). L'apoE interférerait en outre avec l'accumulation de calcium et diminuerait la transition du phosphatidylinositol (115-117).

### **2.6.5 L'apolipoprotéine E et le muscle**

Les cellules du muscle lisse ont un rôle critique dans le développement de l'athérosclérose. La plupart du temps, c'est le premier type cellulaire à se retrouver au niveau de la plaque d'athérome. Dans une artère saine, les cellules du muscle lisse se retrouvent dans un état quiescent. Suite à des dommages dans l'artère et à la dénudation de l'endothélium, les cellules du muscle lisse sont activées grâce à des facteurs de croissance et à des cytokines. Les cellules du muscle lisse migrent ensuite vers l'intima où elles prolifèrent et forment la neointima (117). Il a été démontré que l'apoE intervenait spécifiquement dans le processus de migration et de prolifération par des mécanismes distincts. L'équipe du Dr Hui a montré à partir de cellules du muscle lisse d'aorte de rat (A7r5) et de cellules du muscle lisse provenant d'une artère coronarienne humaine que l'apoE purifiée inhibait la migration et la prolifération cellulaires médiées par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et les LDL oxydées (oxLDL) (118). Cet effet était accompagné d'une baisse de l'activité MAP kinase et d'une réduction du niveau d'ARNm de la cycline D1, ce qui suggère l'arrêt du cycle cellulaire en  $G_0/G_1$  (119). Cette même équipe a montré que l'effet de l'apoE sur la prolifération et non sur la migration était causé par l'activation de l'*inducible nitric oxide synthase* (iNOS) ou par la liaison aux HSPG (118;120). L'apoE inhiberait plutôt la migration des cellules du muscle lisse en se liant à la LRP-1, ce qui activerait l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), puis la protéine kinase A (PKA) (120-122). Hui et al. ont montré que l'isoforme apoE3 était plus efficace que l'apoE2 pour inhiber la prolifération des cellules du muscle lisse, alors que l'apoE4 n'avait aucun effet. Les trois types d'isoformes possèdent toutefois les mêmes aptitudes pour empêcher la migration des cellules du muscle lisse (123) (Fig. 2).

### 2.6.6 L'apolipoprotéine E et le cerveau

Des études *in vitro* de Nathan et al. à partir de neurones provenant de ganglions ont permis de démontrer que l'apoE3 des  $\beta$ -VLDL permettait d'induire l'extension (*outgrowth*) des neurones, alors que l'apoE4 avait un effet opposé (124). Peu après, le même résultat a été obtenu, mais cette fois-ci avec une incubation avec des HDL (125). L'effet stimuloire de l'apoE3 sur la croissance neuronale a été démontré dans plusieurs lignées neuronales (126-129). DeMattos et al. ont transfecté de façon stable la construction pcDNA3-apoE3 dans les cellules Neuro-2A et ils ont montré qu'une hausse de la synthèse d'apoE3 endogène corrélait avec une stimulation de l'extension des neurones et ce, en absence de  $\beta$ -VLDL et de lipides exogènes (126). Cette action de l'apoE3 est reliée à son interaction avec des récepteurs membranaires qui activent certaines voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire. Plusieurs études ont recensé une inhibition de l'extension neuronale lors d'utilisation d'anticorps contre la LRP (125;128). Une question demeurait toutefois ambiguë. Sachant que l'apoE3 et l'apoE4 ont la même affinité pour la LRP, comment expliquer leur effet contraire sur l'extension des neurones? La réponse s'explique par une autre propriété de l'apoE sur la stabilité du réseau cytosquelettique. Il a été découvert à partir des cellules Neuro-2 que l'apoE3 s'accumulait davantage que l'apoE4 dans le milieu intracellulaire. Il a été démontré de plus que l'apoE3 interagissait mieux que l'apoE4 avec la tubuline, ce qui résultait en une plus grande polymérisation des microtubules (130). Finalement, la production et le dépôt excessifs de peptides  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) jouent un rôle crucial dans la pathologie de l'Alzheimer (82;83) et une étude récente a montré que la protéine tau (associée aux microtubules) est essentielle à la neurotoxicité causée par les peptides  $A\beta$  (131). Contrairement à l'apoE3, l'apoE4 stimulerait la phosphorylation de tau, ayant comme conséquence d'empêcher l'assemblage adéquat des microtubules (132).

### **2.6.7 Les autres rôles de l'apolipoprotéine E**

L'apoE possède plusieurs autres fonctions. Elle permet notamment l'activation d'enzymes clés impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines telles que la lipase hépatique, la CETP et LCAT (133-135). L'apoE possède une activité anti-oxydante (E2>E3>E4); elle est capable d'inhiber l'oxydation des lipoprotéines par le cuivre et de lier certains ions métalliques comme le  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$  (136). De cette façon, l'apoE pourrait empêcher l'accumulation de LDL oxydées (oxLDL) qui sont impliquées dans le processus de l'athérosclérose (136). Il a été observé que l'expression de l'apoE était directement proportionnelle à l'augmentation de cholestérol estérifié dans la glande surrénale et corrélait inversement à la stéroïdogénèse par un mécanisme impliquant l'AMPc et la protéine kinase C (PKC) (137-139) (Fig. 2).

En résumé, l'apoE est une molécule pléiotrope. Les fonctions globales de l'apoE dans l'organisme sont majoritairement de nature anti-athérogénique. Elle joue un rôle extrêmement important dans l'épuration des lipoprotéines, la synthèse et la sécrétion de VLDL par le foie, le transport inverse du cholestérol vers le foie, l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et des cellules du muscle lisse, l'extension des neurones, l'activation d'enzymes du métabolisme des lipoprotéines et l'oxydation des lipides. L'apoE est également synthétisée et sécrétée par le tissu adipeux. Cependant, peu d'équipes de recherche se sont consacrées à l'étude de cette protéine dans les adipocytes et son rôle demeure encore inconnu.

## **3. Le tissu adipeux et les adipocytes**

### **3.1 Généralités**

Les adipocytes dans l'organisme captent les acides gras non estérifiés (NEFA), ainsi que les résidus de lipoprotéines et permettent le stockage des graisses principalement sous forme de triglycérides. Un déséquilibre entre l'apport en lipides et la dépense énergétique peut entraîner des troubles

métaboliques sévères. Un excès ou une diminution de la taille du tissu adipeux résultent respectivement en l'apparition de maladies comme l'obésité et la lipodystrophie. De plus, le tissu adipeux étant un organe endocrinien, il synthétise et sécrète plusieurs hormones qui peuvent agir sur d'autres tissus cibles tels que le cœur, le foie, le muscle et le pancréas. Une homéostasie inadéquate du tissu adipeux peut par conséquent entraîner des changements au niveau du métabolisme du glucose et des lipides et causer la résistance à l'insuline, le diabète de type II, le syndrome métabolique ou des maladies cardiovasculaires (4;140).

### **3.2 La différenciation cellulaire et l'adipogénèse**

Le processus de différenciation cellulaire des adipocytes est complexe et peut être regroupé en plusieurs étapes. Les cellules souches donneraient naissance à des cellules précurseurs mésenchymales, puis à des préadipocytes par des événements moléculaires mal compris. Une étape déterminante dans le développement des adipocytes est l'arrêt de la croissance cellulaire. Il s'agit d'un arrêt du cycle cellulaire qui est causé la majorité du temps par le contact entre les cellules lorsqu'il y a confluence (141). Cette étape est essentielle pour amorcer la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures. La plupart des systèmes de culture *in vitro* de préadipocytes comme les cellules 3T3-L1 de souris requièrent un cocktail de différenciation incluant de l'insuline, du dexaméthasone (DEX) et de l'isobuthylmethylxanthine (IBMX). Ces composés permettent l'activation des voies de signalisation et le déclenchement du processus de différenciation(142). La cellule accumule dès lors beaucoup de lipides (surtout des triglycérides) et des changements relatifs à l'expression de nombreux gènes surviennent (143;144). Il y a des altérations au niveau de la matrice extracellulaire et un remodelage du cytosquelette, faisant en sorte que les préadipocytes de forme fibroblastique se transforment en adipocytes matures de forme sphérique avec l'apparition de vacuoles lipidiques (Fig. 3).

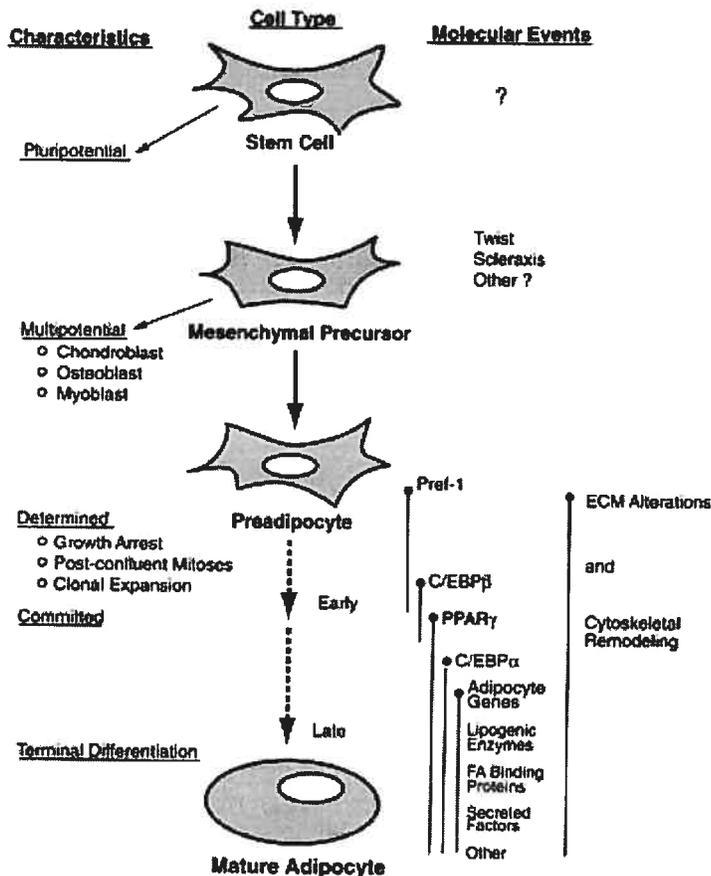


Figure 3. **Le développement des adipocytes.** La différenciation des adipocytes est un long processus faisant intervenir plusieurs gènes clés et des changements morphologiques importants (section 3) (142).

### 3.3 Facteurs modulant la différenciation des adipocytes

#### 3.3.1 Les hormones et les facteurs de croissance

Les cytokines et les facteurs de croissance, en liant leurs récepteurs sur la membrane plasmique, influencent grandement la différenciation des adipocytes via l'activation de régulateurs intracellulaires qui médient différents effets sur la croissance cellulaire et le métabolisme des lipides. L'hormone de croissance (GH) permettrait la différenciation des cellules de souris 3T3-F442A en adipocytes en induisant un état anti-mitogénique, ce qui

serait accompagné par une baisse de la production de protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et le collagène  $\alpha$ -I (145). Cet effet n'est cependant pas observé dans tous les systèmes étudiés, puisque la GH n'a pas d'effet sur la différenciation des adipocytes chez l'humain et le rat (146;147). La GH active la transcription génique de l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-I) qui promouvoit la différenciation des adipocytes. Une étude a montré que l'IGF-I permettait la différenciation des cellules Ob1771 via un modèle autocrine/paracrine (148).

Il existe également plusieurs hormones et facteurs de croissance qui inhibent la différenciation cellulaire des adipocytes dont le facteur de croissance épidermal (EGF) et le TGF- $\alpha$  agissent via la classe de récepteur EGF. Il a été montré que EGF inhibait la différenciation des préadipocytes de souris, de rat et d'humain (149;150), tandis qu'une surexpression stable de TGF- $\alpha$  dans les souris et dans des lignées cellulaires permettaient d'inhiber la différenciation des adipocytes en plus de réduire de 50% le gras corporel (151). Dans la plupart des modèles de culture cellulaire, le TGF- $\beta$  agit comme inhibiteur de la différenciation des adipocytes probablement en permettant une hausse de la synthèse des composantes de la matrice extracellulaire (152-155). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le TNF- $\alpha$  empêchait la différenciation des adipocytes en partie en réduisant le niveau d'ARNm et de protéines LPL. Étant donné que le TNF- $\alpha$  engendre aussi l'apoptose dans les cellules tumorales, il n'est pas exclu qu'il puisse affecter la survie des adipocytes en plus de diminuer la masse en tissu adipeux (156).

### **3.3.2 Les facteurs de transcription**

La conversion des pré-adipocytes en adipocytes matures est effectuée majoritairement grâce à deux familles de facteurs de transcription nommées PPAR et C/EBP qui sont des facteurs critiques dans le processus de différenciation des adipocytes.

Il existe trois types de PPAR soient PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\delta$  (appelé aussi PPAR- $\beta$ ) et PPAR- $\gamma$ . Les PPARs appartiennent à la famille de récepteur nucléaire de type II. Les prostaglandines (PGJ2, PGH1 et PGH2), les acides gras et leurs composés dérivés comptent parmi les ligands qui permettent l'activation des PPARs (157). Ils peuvent donc ensuite hétérodimériser avec le récepteur RXR et lier une séquence spécifique (PuGGTCA) correspondant à son élément de réponse (PPRE) sur le promoteur de gènes cibles afin d'induire leur transcription (158;159). Il a été montré que PPAR- $\gamma$  activait la transcription de la LPL, FAT/CD36, FATP, l'acétyl-CoA carboxylase, la synthétase d'acides gras, et la ATP-citrate lyase, alors qu'elle réprime l'expression de la leptine et la résistine (160). PPAR- $\alpha$  est exprimé principalement dans le foie, le cœur, le muscle et le tissu adipeux où il permet l'oxydation des acides gras, alors que PPAR- $\beta/\delta$  est exprimé dans tous les tissus et agit au niveau de l'oxydation des acides gras et de la thermogénèse dans le tissu adipeux (161;162). En effet, des souris transgéniques ayant une forme active de PPAR- $\beta/\delta$  dans le tissu adipeux sont résistantes à l'obésité, aux hyperlipidémies et aux stéatoses tissulaires. Elles sont résistantes à l'obésité lorsqu'elles sont nourries avec une diète riche en gras ou lorsqu'elles sont prédisposées génétiquement (*Lepr<sup>db/db</sup>*) (163). PPAR- $\gamma$  est majoritairement exprimé dans le tissu adipeux et le foie, mais également dans le muscle (164). Il existe deux types d'isoformes de PPAR- $\gamma$  dans le tissu adipeux; PPAR- $\gamma$ 1 (ubiquitaire) et PPAR- $\gamma$ 2 (spécifique aux adipocytes). La protéine PPAR- $\gamma$ 2 est constituée de 30 acides aminés de plus que PPAR- $\gamma$ 1 à son extrémité amino-terminale et serait plus apte à l'activation génique (165). Des études *in vitro* suggèrent d'ailleurs que PPAR- $\gamma$ 2 serait plus important que PPAR- $\gamma$ 1 dans le processus d'adipogénèse (166;167). Dans les adipocytes, PPAR- $\gamma$  intervient dans le processus de l'adipogénèse, de la lipogénèse, de l'entreposage de lipides et de la production d'adipokines. Dans le foie, il permet la lipogénèse et l'entreposage de lipides et il régule la sensibilité à l'insuline dans le corps entier (161). L'absence de PPAR- $\gamma$  chez

la souris empêche le développement adéquat du tissu adipeux, alors que chez l'humain, la présence d'un seul allèle avec des mutations dominantes-négatives dans le gène *PPAR $\gamma$*  entraîne une lipodystrophie partielle, ainsi que la résistance à l'insuline (164;168-172).

La famille de facteurs de transcription C/EBP a diverses fonctions dans la prolifération et la différenciation cellulaire, le métabolisme, et l'inflammation dans plusieurs types cellulaires comme les hépatocytes, les adipocytes et les cellules hématopoïétiques (173). Elle est constituée de 6 membres (C/EBP $\alpha$ -C/EBP $\zeta$ ) et possède un domaine d'activation transcriptionnel basique et un motif adjacent de glissière de leucines, ce qui permet l'homo- ou l'hétérodimérisation (173). Lors de la différenciation cellulaire des adipocytes, C/EBP- $\beta$  et C/EBP- $\delta$  sont les premiers à être exprimés, suivis de C/EBP- $\alpha$ . Il a été avancé que C/EBP- $\beta$  et C/EBP- $\delta$  formeraient un hétérodimère et activeraient la transcription de C/EBP- $\alpha$ , de même que PPAR- $\gamma$  (174;175). Plusieurs expériences ont permis de démontrer le rôle très important de C/EBP dans la différenciation des adipocytes. L'expression ectopique de C/EBP- $\alpha$  et - $\beta$  dans des cellules 3T3 cultivées en absence de stimuli adipogéniques permettait d'initier le processus d'adipogénèse, tandis que C/EBP- $\delta$  accentuait le processus (176-178). L'utilisation d'oligonucléotides antisens contre C/EBP- $\alpha$  a permis de montrer un blockage au niveau de la différenciation, résultant en une réduction de l'accumulation de triglycérides et des changements d'expression de plusieurs gènes dans les préadipocytes 3T3-L1 (179). Finalement, les souris déficientes en C/EBP- $\alpha$  meurent d'hypoglycémie peu longtemps après leur naissance et ont une accumulation réduite de lipides dans le tissu adipeux (180). Cette étude a pu montrer l'implication de C/EBP- $\alpha$  dans le métabolisme du glucose. Les souris déficientes en C/EBP- $\alpha$  ont une expression réduite de la *glycogen synthase* et de trois enzymes impliquées dans la synthèse du glucose (la glucose-6-phosphatase, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), et la tyrosine aminotransférase), empêchant la synthèse *de novo* du glucose

(180). Il a été montré que C/EBP- $\alpha$  liait et permettait d'influencer la transcription d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du glucose. Il active la transcription de la protéine de liaison aux acides gras des adipocytes (aP2), la *stearoyl-CoA desaturase1* (SCD1), le transporteur de glucose GLUT-4, la PEPCK, la leptine et le récepteur de l'insuline (142).

### 3.4 L'adipocyte mature

La différenciation des préadipocytes immatures en adipocytes matures occasionne des changements d'expression d'une panoplie de gènes ayant des fonctions variées dans la cellule. La présence de l'ARNm de la LPL, par exemple, est un signe de l'état précoce de différenciation des adipocytes et serait même considérée parfois comme étant un marqueur de l'arrêt de croissance cellulaire (181;182). Le changement dans le type et le niveau des composantes de la matrice extracellulaire et du cytosquelette permet ensuite l'expression de C/EBP- $\alpha$  et PPAR- $\gamma$  (142). Ces deux protéines sont impliquées dans la phase terminale de différenciation où l'adipocyte augmente la lipogénèse *de novo* et acquiert la sensibilité à l'insuline. Ce processus est accompagné d'une hausse accrue (10-100 fois) de la synthèse d'enzymes impliquées dans le métabolisme des triglycérides tels que l'ATP citrate lyase, l'enzyme NADP-malic, l'acétyl-CoA carboxylase, SCD1, la glycerol-3-phosphate acyltransférase, la glycerol-3-phosphate déhydrogénase, la synthase d'acide gras et la glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase. Il y a une hausse des transporteurs de glucose, de récepteurs d'insuline et de la sensibilité à l'insuline. On remarque aussi une augmentation de la synthèse de l'aP2, de FAT/CD36, un transporteur d'acides gras situé à la surface des adipocytes, et de la périlipine, une protéine associée aux vacuoles lipidiques. Une fois matures, les adipocytes sont aptes à synthétiser et à sécréter plusieurs protéines appelées adipokines (leptine, TNF- $\alpha$ , IL-6, adiponectine, résistine, ASP) qui peuvent agir au niveau du tissu adipeux ou sur plusieurs autres organes afin de médier plusieurs réponses physiologiques (142).

### 3.5 Les adipokines

Les adipocytes matures sécrètent des adipokines qui affectent la réponse immunologique, les fonctions vasculaires et la régulation de l'appétit.

Le gène *Ob* code pour une protéine appelée leptine qui est exprimée majoritairement dans le tissu adipeux (183). Une mutation dans le gène de la leptine mène à l'obésité, l'hyperphagie et la résistance à l'insuline dans les souris *ob/ob* (183). La leptine agit principalement au niveau de son récepteur (OB-R) situé dans l'hypothalamus, mais aussi dans les tissus périphériques comme le tissu adipeux où elle réduit la prise de nourriture et stimule la dépense énergétique (184). L'insuline, les estrogènes et les glucocorticoïdes activent la production de la leptine, alors que la GH et les androgènes la répriment. Plus spécifiquement, il a été montré que C/EBP- $\alpha$  se liait au promoteur du gène *Ob* et activait sa transcription, tandis que PPAR- $\gamma$  avait l'effet contraire (185;186).

Le TNF- $\alpha$  induit la résistance à l'insuline, l'anorexie et la perte de poids (184). La quantité d'ARNm TNF- $\alpha$  est proportionnelle à l'adiposité du corps humain et diminue lorsqu'une personne obèse perd du poids (187). Les triglycérides et les NEFA semblent être des stimulateurs de la synthèse de TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux, puisque des rats nourris avec une diète riche en gras sécrètent davantage de TNF- $\alpha$  (188). L'administration chronique de TNF- $\alpha$  affecte l'adipocyte mature en causant un changement du phénotype de l'adipocyte, le rendant de forme fibroblastique semblable aux préadipocytes (189). Le TNF- $\alpha$  inhibe entre autres l'expression des deux plus importants régulateurs de la différenciation des adipocytes soient CEBP- $\alpha$  et PPAR- $\gamma$ 2 (190;191). Ceci pourrait avoir un effet sur la synthèse de protéines telles que la LPL, aP2, la synthétase d'acides gras, l'acétyl-CoA carboxylase, la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH), GLUT-4, ou autres.

Il existe d'autres adipokines telles que l'interleukine-6 (IL-6), l'adiponectine, la résistine et la protéine stimulant l'acylation (ASP). Il a été montré que l'expression de l'interleukine-6 (IL-6) corrélait positivement avec l'indice de masse corporelle (IMC) (192). IL-6 abaisse le niveau d'ARNm et de protéines LPL et serait impliquée dans la perte de poids suite à l'apparition de certains cancers (193). Il régule à la baisse le gène et la protéine adiponectine *in vitro* dans des cellules 3T3-L1 (194). Le TNF- $\alpha$ , la norépinéphrine, l'isopraline, et les agonistes du récepteur  $\beta$ 3-adrénergique augmentent la production d'IL-6, tandis que le dexaméthasone a l'effet opposé (195;196). L'adiponectine (Acrp30, adipoQ) est une autre protéine sécrétée par le tissu adipeux (197). Le gène de l'adiponectine est régulé à la baisse par les glucocorticoïdes, les agonistes  $\beta$ -adrénergiques, le TNF- $\alpha$  et l'obésité, tandis qu'il est induit par IGF-I, l'exposition au froid et chez les personnes minces (198). Meada et al. ont su montrer que les souris déficientes en adiponectine avaient de la difficulté à épurer les acides gras plasmatiques vers les tissus périphériques, synthétisaient beaucoup de TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux, possédaient des concentrations de TNF- $\alpha$  plasmatiques très élevées et développaient la résistance à l'insuline lorsque les souris étaient nourries avec une diète riche en gras (199). La résistine a d'abord été décrite comme étant une protéine impliquée dans la résistance à l'insuline (200). Le niveau de résistine dans le sérum était plus élevé chez les souris obèses et les souris diabétiques. La résistine diminue l'incorporation de glucose médiée par l'insuline et augmente la production de glucose hépatique *in vivo* (200;201). Finalement, les souris déficientes en ASP ont une clairance des triglycérides retardée en comparaison avec les animaux témoins (184). De plus, lorsqu'il y a délétion de l'ASP dans les souris ob/ob, il n'y a pas de réduction de la dépense énergétique normalement retrouvée, ce qui indique un rôle probable de l'ASP dans la dépense énergétique (202).

### 3.6 Les cellules de liposarcome humain SW872

Il existe plusieurs lignées cellulaires (3T3-L1, 3T3-F442A, Ob17,...) permettant d'étudier le métabolisme des lipides au niveau du tissu adipeux. Ces lignées immortalisées provenant du rat ou de la souris possèdent cependant quelques différences sur le plan métabolique avec l'humain. Pour cette raison, nous avons opté pour les cellules humaines SW872 qui furent isolées d'un mâle caucasien de 36 ans. Ces cellules sont issues de tumeurs malignes et ont été classées comme étant un liposarcome (ATCC). Ces tumeurs sont retrouvées la plupart du temps dans la région rétropéritonéale et au niveau de l'épaule. Morton et al ont montré que les cellules SW872 exprimaient la LRP, l'adipsin, la LPL, la CETP, CD-36 et la cavéolin 1 et 2 lorsqu'elles sont à 80% de confluence (203). Izem et al. ont montré que les SW872 sécrétaient du cholestérol estérifié et l'incubation de ces cellules avec de l'oléate résultait en l'accumulation de gouttelettes lipidiques (204). Ces cellules sont quelques peu différenciées, puisqu'elles expriment certains marqueurs de différenciation comme la LPL et PPAR- $\gamma$  (14;204). Par conséquent, les cellules SW872 ne requièrent pas de cocktail de différenciation comme la plupart des autres modèles d'adipocytes. Elles sont également immatures et elles ont besoin d'être cultivées sur une période de deux semaines en présence de sérum afin de faciliter la différenciation terminale et la maturation des cellules, représentées par l'accumulation de lipides. Il faut cependant être prudent avec l'utilisation d'une lignée cellulaire (SW872) quant à l'extrapolation des résultats expérimentaux issus de celle-ci. En effet, une lignée tumorale peut avoir certaines altérations au niveau de son programme génétique ou métabolique faisant en sorte qu'elle ne se comporte pas exactement comme des adipocytes normaux. Néanmoins, il s'agit d'un bon modèle pour étudier la biologie des adipocytes.

Au sein de notre laboratoire, Wassef et al. ont caractérisé davantage les cellules SW872 en se penchant plus particulièrement sur l'implication de l'apoE et l'apoC-I dans la maturation des cellules (14). Ces travaux ont

montré que bien que régulées différemment, l'apoE et l'apoC-I semblent jouer un rôle important dans la maturation des cellules SW872.

**Apolipoprotein E promotes cell proliferation and  
inhibits maturation of human adipocytes**

Jean-François Carmel, Lise Bernier, Jean Davignon and Jeffrey S. Cohn  
*(Ce manuscrit sera soumis sous peu à Journal of Biological Chemistry)*

Hyperlipidemia and Atherosclerosis Research Group  
Clinical Research Institute of Montreal, Quebec, Canada

Address correspondence to: Dr Lise Bernier, Hyperlipidemia and  
Atherosclerosis Research Group, Clinical Research Institute of Montreal, 110  
Pine Avenue West, Québec, Canada, H2W 1Y7. Tel: (514) 987-5635. Fax:  
(514) 987-5700. E-mail : XXXXXXXXXX

Running title: ApoE and adipocyte proliferation

## 1. ABSTRACT

ApoE plays a central role in cellular and systemic lipid metabolism. It is synthesized and secreted by adipose tissue but its function in this tissue has not been clearly elucidated. In order to investigate the role of apoE in adipocyte lipid metabolism and differentiation, we stably overexpressed apoE3 in human SW872 liposarcoma cells. Surprisingly, an increase in cellular growth and a decrease in triglyceride and cholesterol levels was observed in apoE-transfected cells cultured for 15 days in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS) or 10% lipoprotein-deficient serum (LPDS), whereas exogenous apoE added to wild-type cells had no effect. ApoE-transfected cells underwent more cell divisions than control cells and there was a significant decrease of PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2 and SCD1 mRNA levels, suggesting that cellular apoE may affect the final differentiation of human adipocytes.

## 2. INTRODUCTION

Apolipoprotein E (apoE) plays a central role in the etiology of atherosclerosis, diabetes and obesity, by regulating both cellular and systemic cholesterol and triglyceride metabolism (14;90;205;206). ApoE is a constituent of chylomicrons, very low-density lipoproteins (VLDL), intermediate-density lipoproteins (IDL) and high-density lipoproteins (HDL). It mediates the clearance of these lipoproteins by binding to heparan sulfate proteoglycans (HSPG), and by acting as a ligand for the LDL receptor (LDLR), the LDL receptor-related protein (LRP), and the VLDL receptor (18-20).

The human apoE gene is located on chromosome 19 and codes for a glycoprotein of 299 amino acids (~34 kDa) (39). ApoE is mainly synthesized and secreted by the liver, but it is also found in many tissues including adipose tissue, brain, skin and macrophages (9-13). In hepatocytes, increased apoE synthesis causes an increase in VLDL-TG and VLDL-apoB

production(7;8), whereas in macrophages, increased apoE synthesis leads to an increase of cholesterol efflux (100;101). The role of apoE synthesized by adipocytes has not however been elucidated.

It is well accepted that adipose tissue is a source of a number of metabolic factors, which have pronounced effects on other organs. Leptin, adiponin, acylation stimulation protein (ASP), adipocyte complement-related protein (Acrp30/AdipoQ), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are prominent examples that play a role in appetite regulation, immune response, vascular function and lipid metabolism (19;142). Zechner et al. have shown that apoE is synthesized and secreted by differentiated mouse 3T3-L1 adipocytes and by human adipose tissue biopsies (13). Furthermore, intracellular apoE protein and mRNA were found to increase during adipocyte differentiation. We have similarly found that apoE protein and mRNA levels increase during maturation of human SW872 liposarcoma cells (14). These cells are partially differentiated adipocytes as shown by the expression of LPL and PPAR- $\gamma$  (14;203). They are however immature and need to be cultured with serum to accumulate lipid droplets. ApoE production may cause lipid accumulation in maturing cells, or conversely, lipid accumulation may be responsible for the increase of apoE production, which then mediates lipid efflux in SW872 cells. In order to shed light on this question and further investigate the effect of apoE on adipocyte lipid metabolism, we have stably overexpressed human apoE in SW872 liposarcoma cells – a cell line which has been used previously to study the biology of human adipocytes (14;207;208).

### **3. EXPERIMENTAL PROCEDURE**

**3.1 Materials.** Human SW872 liposarcoma cells were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose, Ham's F-12 nutrient mixture and geneticin were obtained from GIBCO (Grand Island, NY). Fetal bovine serum

(FBS) was purchased from GIBCO (St. Louis). Bovine lipoprotein-deficient serum (LPDS) was prepared by ultracentrifugation at density 1.25 g/mL using solid KBr and was dialyzed against physiological saline (0.15M).

**3.2 Transfection.** SW872 cells were transfected (lipofectamine and Plus™ Reagent, Invitrogen) with the expression vector pCDNA<sub>3</sub> containing the cDNA of human apoE3. Human apoE cDNA was prepared as published (209) The cDNA was sequenced on an Applied Biosystems 373A DNA sequencer using a Thermo Sequenase dye terminator kit (Amersham Pharmacia Biotech, Baie D'urfé, Que.), before subcloning into mammalian expression vector pCDNA<sub>3</sub>. Stable transfectants were selected with geneticin (G418) and different clones were chosen for further characterization.

**3.3 Cell culture.** SW872 cells (initially  $0.5-1.0 \times 10^6$  per well) were plated onto six-well plates (Falcon) and cultured in DMEM high glucose: Ham's F12 (3:1, v/v) supplemented with NaHCO<sub>3</sub> (3.7 g/L), 100 μM non-essential amino acids, 50 U/mL penicillin, 50 μg/ml streptomycin, 10% FBS and geneticin (transfected cells; 0.3 mg/mL), in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Non-transfected cells (WT), vector-only transfected cells (V) and apoE-transfected cells (E+) were incubated for 2, 8 or 15 days with 10% fetal bovine serum (FBS) or 10% lipoprotein-deficient serum (LPDS). Media was changed every two days. Cells were washed two times with PBS and counted by trypan blue exclusion using a hemacytometer.

**3.4 Lipid extraction and assays.** Cells were washed two times with PBS before being extracted three times (one hour each) with 1 mL hexane: isopropanol (3:2, v/v). Total extracts were centrifuged 10 minutes at 1500g. Supernatants were dried under nitrogen. Total cholesterol and triglyceride were quantified by enzymatic reaction using reagents obtained from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN).

**3.5 Protein assays.** ApoE was quantified by ELISA (210). Cells were washed two times with PBS, harvested and dissolved in lysis buffer (50mM TRIS-Base, 150mM KCl and 1% Tween) before quantification of cellular apoE by ELISA. The ELISA was specific for human apoE and did not recognize bovine apoE in the FBS. To measure total cellular proteins, cells were washed with PBS and solubilised with 0.1M NaOH. Total proteins were stored for one day at 4°C before quantification according to Lowry et al. (211) with albumin as a standard.

**3.6 CFDA-SE fluorescent-dye cell labeling and division assay.** CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) (Vybrant™ CFDA SE Cell Tracer Kit (V-12883), Molecular Probes, Eugene, Or) was used to verify cell division kinetics. About  $8 \times 10^6$  cells were centrifuged, resuspended in 0.1% bovine serum albumin-phosphate-buffered saline (BSA-PBS) and filtered through a 70  $\mu$ m nylon filter. A solution containing 0.1% BSA-PBS and 20 $\mu$ M CFDA-SE (prepared with DMSO provided with the kit) was added to the cells at a final concentration of 10 $\mu$ M of CFDA-SE. The cells were mixed gently and incubated for 10 minutes in a 37°C waterbath. The reaction was stopped by adding DMEM-F12 (3:1) containing 10% FBS. The cells were washed 3 times with medium to allow free, unreacted CFDA-SE, to diffuse out. Cells were plated in 6 wells plate ( $0.6 \times 10^6$  cells/well) and an aliquot was kept to determine parental generation as reference. CFDA-SE-labeled cells were analysed by flow cytometry as described below.

**3.7 Flow cytometry.** CFDA-SE-labeled cells were washed 2 times with PBS and resuspended in 0.1% BSA-PBS before analysis on FACScan (Becton Dickinson) and Cell Quest Pro software. Final analysis of results was done on Mod Fit software.

**3.8 mRNA assays.** RNA was extracted with Trizol© (Invitrogen, Burlington, Ontario), according to the manufacturer's instructions and quantified using a

spectrophotometer. Reverse transcriptase reaction was performed and cDNA was amplified by real-time PCR on an MX4000 using the SYBR green mastermix purchased from Qiagen (Mississauga, Ontario). Analyses were done with the Mx4000 software. PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2, SCD1, INSR, CD36, C/EBP- $\alpha$  and LRP mRNA levels were normalised with ribosomal protein S14. All primers were designed using *Primer3* software and purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario).

**3.9 Statistical Analysis.** Data are expressed as means  $\pm$  SD or SEM. Statistical analyses were performed using unpaired Student's *t*-tests.

#### 4. RESULTS

*Characterization of apoE-transfected SW872 cells.* To study the role of endogenous apoE in adipocyte lipid metabolism and maturation, SW872 liposarcoma cells were stably transfected with human apoE3. After selection in geneticin, different clones were cultured for two days and then characterized. Cellular and secreted apoE were determined in non-transfected wild-type cells (WT), six vector-only transfected cell lines (V) and six apoE-transfected cell lines (E+, E++, E+++). The amount of cellular apoE was similar in V and WT cells. Cellular apoE was increased 3-, 8- and 25-fold, respectively, in E+, E++ and E+++ transfected cells (Fig. 4A). ApoE levels in cell media were much higher than cellular apoE levels and were significantly increased in apoE-transfected cells (i.e., 6-, 25- and 100-fold, resp., Fig. 4B).

*Endogenously synthesized apoE affects cell growth and lipid accumulation in SW872 cells.* Two apoE-transfected cell lines, expressing 3- and 25-times more cellular apoE, were used to evaluate the effects of increased concentrations of cellular apoE on lipid metabolism. As shown in Figure 5, cells incubated for two days in the presence of 10% FBS showed no difference in cell growth (cell number and total cellular protein) or lipid content (triglyceride and cholesterol), despite a large increase in cellular apoE. In

contrast, when SW872 cells were cultured for 15 days in the presence of FBS, a 2-fold increase was observed in cellular growth in apoE-transfected cells, as reflected by an increase in both cell number and total cell protein. At the same time, there was a significant decrease in levels of cellular triglyceride (~75%,  $P < 0.001$ ) and cholesterol (~45%,  $P < 0.001$ ) (Fig. 5C and D). These effects of apoE on cellular growth and lipid accumulation were not dose-dependent, since the magnitude of observed effects was identical whether cells expressed 3 or 25 times more apoE. Similar results were obtained with 4 other apoE-transfected cell lines. A time-course study showed that the effect of apoE on cell growth was already apparent after 8 days in culture (data not shown).

In order to determine the effect that an absence of lipoproteins in serum would have on cellular growth and lipid accumulation in SW872 cells overexpressing apoE, WT, V and apoE-transfected cells were cultured for 15 days in serum devoid of lipoproteins (10% LPDS). An increase in cellular growth and a reduction in cellular lipids were observed for the two apoE-transfected cells (Fig. 6).

*Exogenous apoE has no impact on cell growth and lipid accumulation in SW872 cells.* To verify if effects on cellular growth and lipid accumulation were due to endogenously-synthesized or exogenous apoE, non-transfected SW872 cells were incubated with medium from vector-only transfected cells (vector medium) or medium from apoE-transfected cells (E+ medium). Cells were cultured for 15 days in the presence of 10% FBS. No effect was observed on cellular growth or lipid levels (Fig. 7), despite large differences in the amount of apoE present in the medium (Fig. 7C).

*Endogenously synthesized apoE affects cell division.* CFDASE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) was used to clarify the specific effect of endogenous apoE on cell growth. CFDASE passively diffuses into cells. When its acetate-groups are cleaved by intracellular

esterase, CFSE is able to form conjugates with intracellular amines and is retained in the cells whereas unconjugated reagent passively diffuses out of the cell. When cells divide the label is distributed between daughter cells, which become half as fluorescent as their parents. Each successive generation of proliferating cells is marked by a two-fold decrement in cellular fluorescent intensity. We used WT, V and E+ cells to study the effect of endogenous apoE on the kinetics of cell division. Cells were incubated for 9 days in presence of 10% FBS. As seen in Figure 8, a peak at day 0 corresponds to the parents or generation 1 (WT; 99%, V; 92% and E+; 90%). At day 9, 90% of WT cells and 92% of V cells were in generation 8, whereas 77% of E+ cells were already in generation 9 and 17% had reached generation 10. These last results suggest an effect of endogenous apoE on cellular proliferation of SW872 cells.

*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA are downregulated in apoE-transfected SW872 cells.* A key step in the pathway of adipocyte differentiation is growth arrest at confluence (141). At this stage, cells accumulate triglycerides and several changes in gene expression occur. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) and CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP- $\alpha$ ) play a major role in adipocyte terminal differentiation (142). Expression of both PPARs follows a typical pattern - there was a decline in the first 8 days, followed by increased expression thereafter (14). PPAR- $\gamma$ 1 and PPAR- $\gamma$ 2 mRNA levels were determined by real-time PCR in WT, V and E+ cells cultured for 2, 8 and 15 days with 10% FBS. At day 2, there was no significant difference in the level of PPAR- $\gamma$ 1 and  $\gamma$ 2 in different cell lines. A decrease of PPAR- $\gamma$ 1 (~35% versus V cells) and PPAR- $\gamma$ 2 (~55% versus V cells) was observed in apoE-transfected cells at day 8. Furthermore, PPAR- $\gamma$  mRNA levels remained low after 15 days in culture and were significantly reduced compared to WT and V cells (Fig. 9). There was no change in C/EBP- $\alpha$  in E+ cells after 2 and 15 days of maturation (Table I).

Other genes involved in lipid and glucose metabolism, such as the insulin receptor (INSR), the LDL receptor-related protein (LRP), and the scavenger receptor CD36 play an important role in cell signaling and lipid incorporation characteristic of cell maturation. The expression of these genes was not affected by apoE overexpression as shown in table I. However, the expression of stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), an enzyme involved in the biosynthesis of monounsaturated fatty acids necessary for triglycerides formation, was significantly decreased after 2 days (-57%,  $P < 0.001$ ) and 15 days (-63%,  $P < 0.001$ ) of maturation in E+ cells.

## 5. DISCUSSION

The results of the present study have shown that increased synthesis and secretion of apoE by SW872 cells promotes cell growth and proliferation. This effect was not dependent on the presence of lipid or lipoproteins in the medium (Fig. 6), nor was it a function of apoE in the medium (Fig. 7). Increased lipid and/or lipoprotein uptake was therefore not responsible for increased cell growth and/or maturation, as supported by data showing that apoE-transfected cells actually had a decrease rather than increase in cellular levels of triglyceride and cholesterol (Fig. 5 and 6). ApoE-transfected cells were found to have undergone more cell divisions than control cells and there was a significant downregulation of PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2 and SCD1 mRNA levels, which suggests that increased endogenous synthesis of apoE may increase proliferation by affecting the final differentiation of human adipocytes.

It has previously been shown that cellular apoE is increased during differentiation of mice 3T3-L1 cells (13). Maturation of human SW872 cells is also associated with an increase in lipid accumulation and an increase in apoE secretion (14). Based on these results, we hypothesized that increased synthesis and secretion of apoE by maturing adipocytes was an important

mechanism whereby these cells could accumulate lipid. Human adipocytes express LRP (203) and it is possible that this receptor plays an important role in adipocyte lipid accumulation through high affinity binding of apoE-containing lipoproteins (18). However, LRP mRNA level was not affected by apoE overexpression (Table I). High level expression of apoE in SW872 cells did not lead to evidence of increased lipid accumulation. Therefore our results suggest that increased apoE synthesis and secretion is more a function of adipocyte maturation than adipocyte maturation being a consequence of apoE function.

The role of apoE in regulating lipid metabolism is well described (20). However, little is known about the effect of apoE on cellular growth. It has been shown that apoE exerts anti-proliferative effects on T lymphocytes by decreasing interleukin-2 activity (112). Hui et al. showed that purified apoE suppressed PDGF- and oxLDL-induced smooth muscle cell proliferation by reducing agonist-stimulated MAP kinase activity and the level of cyclin D mRNA (118;119;121). This inhibitory effect on smooth muscle cell proliferation was thought to be due to activation of iNOS and/or to apoE binding to heparan sulfate proteoglycans. Ho et al. have found that both exogenous and endogenous apoE decreased cell proliferation and inhibited activation of MAPKs and stimulation of DNA synthesis by serum in rat fibroblast F111 cells (212). On the other hand, apoE has also been shown to exert positive effects on cell growth. In brain, apoE3 stimulates neurite outgrowth in several culture systems (125;126;128;130). DeMattos et al. stably transfected Neuro-2a cells with pcDNA3-apoE3 vector and showed that high endogenous apoE3 synthesis stimulated neurite outgrowth in the absence of  $\beta$ -VLDL or other exogenous lipid sources (126;127). Recently, Chen et al. showed that apoE was involved in cell proliferation in ovarian cancer (213). Interestingly, they found that a cell cycle arrest in G<sub>2</sub> phase and subsequent apoptosis were induced when the ovarian cancer cell line (OVCAR3) was transfected with apoE-specific siRNA. This suggests a role of

apoE in the regulation of the cell cycle and is in line with our results showing that apoE overexpressing cells (E+) divide faster than control cells. After 2 days of culture, the number of generations was similar for WT, V and E+ cells (not shown). During maturation however differences between generations increased and there was a difference of at least one generation after 9 days (Fig. 8). Interestingly, only endogenously synthesized apoE had an effect on cell proliferation. Quinn et al. recently identified a cytosolic and a nuclear pool of apoE (49). This nuclear localization of apoE suggests that apoE could act directly (or indirectly) on gene transcription. Overexpression could have forced more apoE into the nucleus, promoting growth and affecting lipid metabolism.

PPAR- $\gamma$  represents a key marker of adipocyte differentiation and plays a crucial role in adipogenesis, lipogenesis and lipid storage, adipokine production and whole-body insulin sensitivity (163;164;171). PPAR- $\gamma$  is expressed as two isoforms. PPAR- $\gamma$ 1 is ubiquitous, while PPAR- $\gamma$ 2 is specific to adipose tissue (214). We found a significant decrease of PPAR- $\gamma$ 1 and 2 mRNA after 8 and 15 days of maturation for E+ cells versus WT and V cells (Fig. 9). Morrison et al. showed that ectopic expression of PPAR- $\gamma$  in non-precursor fibroblastic cells resulted in their conversion to adipocytes (215). Moreover, the stimulation of PPAR- $\gamma$  increased cyclin-dependent kinase inhibitors p18 and p21 mRNA and protein levels, suggesting a role of PPAR $\gamma$  in a mechanism coupling growth arrest and adipocyte differentiation. It was shown that PPAR- $\gamma$  inhibited E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of protein phosphatase 2A (PP2A), preventing the entry in S phase (216). It is possible that downregulation of PPAR- $\gamma$  in SW872 cells overexpressing apoE prevents or delays cell cycle arrest through reduced activation of modulators of the cell cycle such as p18, p21 or E2F. Interestingly, at day 2, the level of PPAR- $\gamma$  mRNA is similar between WT, V and E+ (Fig. 9) and there is no difference in cell growth and lipid accumulation (Fig. 5) despite an overexpression of apoE in E+ cells (Fig. 4).

In contrast, at day 8 and 15, there is an increase of cell growth and a decrease of triglyceride and cholesterol content. The expression of many genes involved in adipogenesis and in lipid metabolism follows a synchronized pattern (142). As a consequence of PPAR- $\gamma$  downregulation, certain proteins required to mediate cell growth and lipid accumulation and under the regulation may be reduced or absent from apoE-transfected cells.

PPAR- $\gamma$  plays an important role in the maintenance of characteristics of mature adipocytes. Tamori et al. (217) overexpressed a dominant negative mutant of PPAR- $\gamma$  lacking 16 C-terminal amino acids (PPAR- $\gamma$ - $\Delta$ C) in mature 3T3-L1 and observed a reduction in cell size, cellular triglyceride content, fatty acid uptake and an increase in the extent of lipolysis. They also found a decrease of insulin receptor, insulin receptor substrate (IRS) and C/EBP- $\alpha$  mRNAs. Also, the specific deletion of PPAR- $\gamma$  in adipose tissue of mice resulted in a diminution of weight gain (218). Since fatty acids can regulate PPAR- $\gamma$  expression, we looked at fatty acid uptake in E+ cells by incubating WT, V and E+ cells for 2 hours with a physiological ratio (219) of [ $^{14}$ C]-oleate-BSA (50 $\mu$ M-100  $\mu$ M) in presence of 10% FBS at day 8. We observed no difference in fatty acid uptake between each kind of cell lines during the time course of our study (not shown), neither did we find any change in CD36 mRNA (Table I).

Insulin signaling has an important role in lipid storage and adipogenesis. Insulin stimulates fatty acid and dietary cholesterol uptake in adipocytes in part by raising the number of LRP molecules at the cell surface of adipocytes (220). Mice with a fat-specific insulin receptor knock-out (FIRKO) exhibit reduced fat mass with two populations of fat cells; small cells and large cells (221). Small adipocytes had lower triglyceride content and showed reduced adipogenic marker C/EBP- $\alpha$  (222). ApoE-transfected SW872 cells have a phenotype similar to FIRKO mice: they are smaller (not shown) and their triglyceride content is reduced in comparison with control

cells. But contrary to FIRKO mice, apoE-transfected cells showed no change in insulin receptor and C/EBP- $\alpha$  mRNA (Table I), suggesting that insulin does not play, or plays only a minor role in the apoE effect in SW872 cells.

In a recent publication, we showed that incubation of SW872 cells without lipoproteins do not impair lipid accumulation, probably by increasing endogenous lipogenesis (14). In the present study we found a decrease in triglyceride and cholesterol accumulation in apoE-transfected cells cultured without lipoproteins (Fig. 6), suggesting a role of endogenous apoE on lipid synthesis in SW872 cells. The effect of apoE overexpression was more pronounced on triglyceride level (Fig. 5 & 6). This leads us to analyse the expression of SCD1 in apoE overexpressing cells. SCD1, which is involved in triglyceride biosynthesis, was significantly decreased after 2 and 15 days of maturation (Table I). It is interesting to note that *SCD1*<sup>-/-</sup> mice show reduced body adiposity and are resistant to diet-induced obesity (223). The absence of *SCD1* also promotes lipid oxidation instead of storage and triglyceride synthesis in these mice (223).

In conclusion, our findings suggest that endogenous apoE produced by apoE-transfected SW872 increases cell growth and inhibits triglyceride and cholesterol accumulation. This inhibitory effect on terminal differentiation may be mediated by a downregulation of PPAR- $\gamma$ 1 and  $\gamma$ 2 expression. In addition the deficient maturation could be a consequence of SCD1 mRNA reduction.

Further work would be required to understand by which mechanism cellular apoE reduces PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2 and SCD1 mRNA, and how this affects cell growth and lipid accumulation.

*Acknowledgments-* The authors acknowledge the help and support of Catherine Bouchard, Geneviève Dubuc, Lucie Boulet, Hélène Jacques, Claudia Rodriguez, Michel Tremblay and Hanny Wassef. This work has been

supported in part by grant # 69097 from the Canadian Institutes for Health Research.

## 6. FOOTNOTES

Abbreviations: apo, apolipoprotein; CFDA SE, carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester; FBS, fetal bovine serum; HSPG, heparan sulfate proteoglycans; LDLR, low-density lipoprotein receptor; LPDS, lipoprotein-deficient serum; LRP, LDLR-related protein; PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor; VLDLR, very low-density lipoprotein receptor.

## 7. LEGENDS

Figure 4. **Cellular and secreted apoE in transfected and non-transfected SW872 cells.** Cellular apoE (A) and medium apoE (B) were measured by ELISA after cells were incubated with DMEM/F12 (3:1, v/v) and 10% fetal bovine serum for two days. Results are shown for non-transfected wild-type (WT) cells, for vector-only transfected cells (V) and for apoE-transfected cells (E+, E++, E+++), expressing different levels of apoE (as indicated). Results represent means  $\pm$  SD.

Figure 5. **Endogenously synthesized apoE promotes cell growth and reduces lipid accumulation in SW872 cells incubated with lipoproteins.** Cells were cultured two or fifteen days in the presence of DMEM/F12 (3:1, v/v) and 10% FBS. Cell number (A), total cellular protein (B), cellular triglyceride (C) and cellular cholesterol (D) were determined in non-transfected wild-type cells (WT), vector-only transfected cells (V) and apoE-transfected cells (E+, E+++; expressing respectively 3 and 25 times more cellular apoE than V and WT cells). Results represent means  $\pm$  SD of four

wells (A and B) or five wells (C and D). Statistically different from V cells by Student's t-test: \*\*\* $P < 0.001$ .

**Figure 6. Endogenously synthesized apoE promotes cell growth and reduces lipid accumulation in SW872 cells incubated without lipoproteins.** Cells were cultured 15 days in the presence of DMEM/F12 (3:1, v/v) and 10% LPDS. Cell number (A), total cellular protein (B), cellular triglyceride (C) and cellular cholesterol (D) were determined in non-transfected wild-type cells (WT), vector-only transfected cells (V) and apoE-transfected cells (E+, E+++; expressing respectively 3 and 25 times more cellular apoE than V and WT cells). Results represent means  $\pm$  SD of four wells (A and B) or five wells (C and D). Statistically different from V cells by Student's t-test: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

**Figure 7. Exogenous apoE has no effect on cell growth and lipid accumulation in SW872 cells.** Cells were cultured for 15 days in the presence of DMEM/F12 (3:1, v/v) and 10% FBS with vector medium (-) (medium from V cells + fresh medium (1:1)) or with E+ medium (+) (medium from E+ cells + fresh medium (1:1)). Medium was changed every two days. Results are shown for cell number (A), total cellular protein (B), apoE in the medium (C), cellular triglyceride (D), and cellular cholesterol (E). Results represent means  $\pm$  SD of four wells (A, B and E) or five wells (C and D). Statistically different by Student's t-test: \*\*\* $P < 0.001$ .

**Figure 8. Endogenously synthesized apoE increases cell division kinetics in SW872 Cells.** Cells were cultured for 9 days in the presence of DMEM/F12 (3:1, v/v), 10% FBS and 10 $\mu$ M of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDASE). Results are shown for non-transfected wild-type (WT) cells, for vector-only transfected cells (V) and for apoE-transfected cells (E+, expressing 3 times more cellular apoE than V and WT cells).

Measurement of cell replication was done using CFDASE and flow cytometry. During maturation of cells, the peaks initially at day 0 (parents) will be shifted to the left after each cell division (generation). Results are representative of two independent experiments of 3 wells.

**Figure 9. Endogenously synthesized apoE downregulates PPAR- $\gamma$ 1 and  $\gamma$ 2 mRNA.** Cells were cultured 2, 8 and 15 days in the presence of DMEM/F12 (3:1, v/v) and 10% FBS. Results are shown for non-transfected wild-type (WT) cells, for vector-only transfected cells (V) and for apoE-transfected cells (E+, expressing 3 times more cellular apoE than V and WT cells). PPAR- $\gamma$ 1 mRNA (panel A) and PPAR- $\gamma$ 2 mRNA (panel B) were quantitated by real-time RT-PCR and were expressed relative to S14 mRNA. Results represent means  $\pm$  SEM and are representative of at least 3 independent experiments. Statistically different by Student's t-test: \*\* $P < 0.01$ .

**Table I. Effect of apoE overexpression on adipocyte gene expression.** Cell lines were incubated 2 or 15 days with FBS. SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase 1), INSR (insulin receptor), LRP (LDL receptor-related protein), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP- $\alpha$ ) and CD36 (scavenger receptor) mRNA levels are relative to S14. Data represent means  $\pm$  SEM of 4 wells from a minimum of two independent experiments. Significantly different from V cells by t-test: \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

Table I

<i>Gene</i>	Day 2 (maturation)		Day 15 (maturation)	
	<b>V</b>	<b>E+</b>	<b>V</b>	<b>E+</b>
<b>SCD1</b>	2.661 ± 0.154	1.154 ± 0.164***	3.320 ± 0.255	1.232 ± 0.020**
<b>INSR</b>	0.046 ± 0.005	0.050 ± 0.007	0.088 ± 0.013	0.068 ± 0.003
<b>LRP</b>	0.272 ± 0.011	0.198 ± 0.022	0.497 ± 0.079	0.586 ± 0.045
<b>CD36</b>	0.00054 ± 0.00011	0.00036 ± 0.00003	0.00055 ± 0.00008	0.00026 ± 0.00011
<b>C/EBP-<math>\alpha</math></b>	0.00161 ± 0.00015	0.00124 ± 0.00031	0.00892 ± 0.00123	0.00533 ± 0.00057

Figure 4

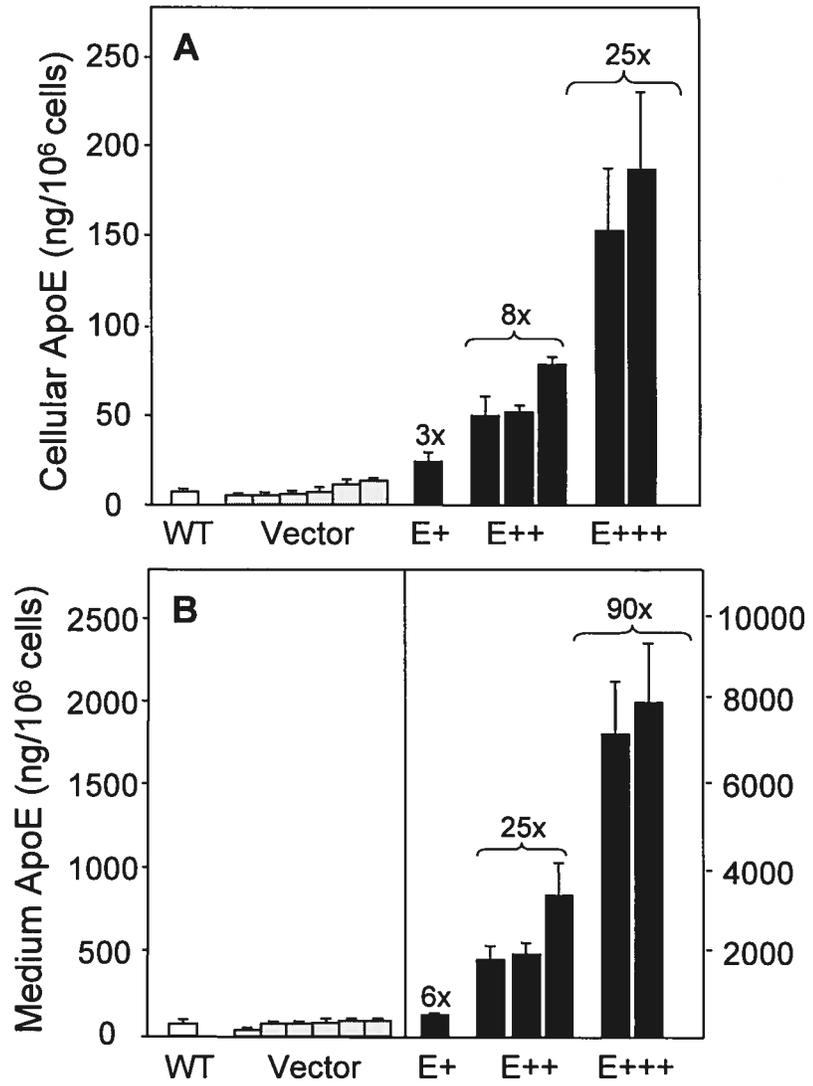


Figure 5

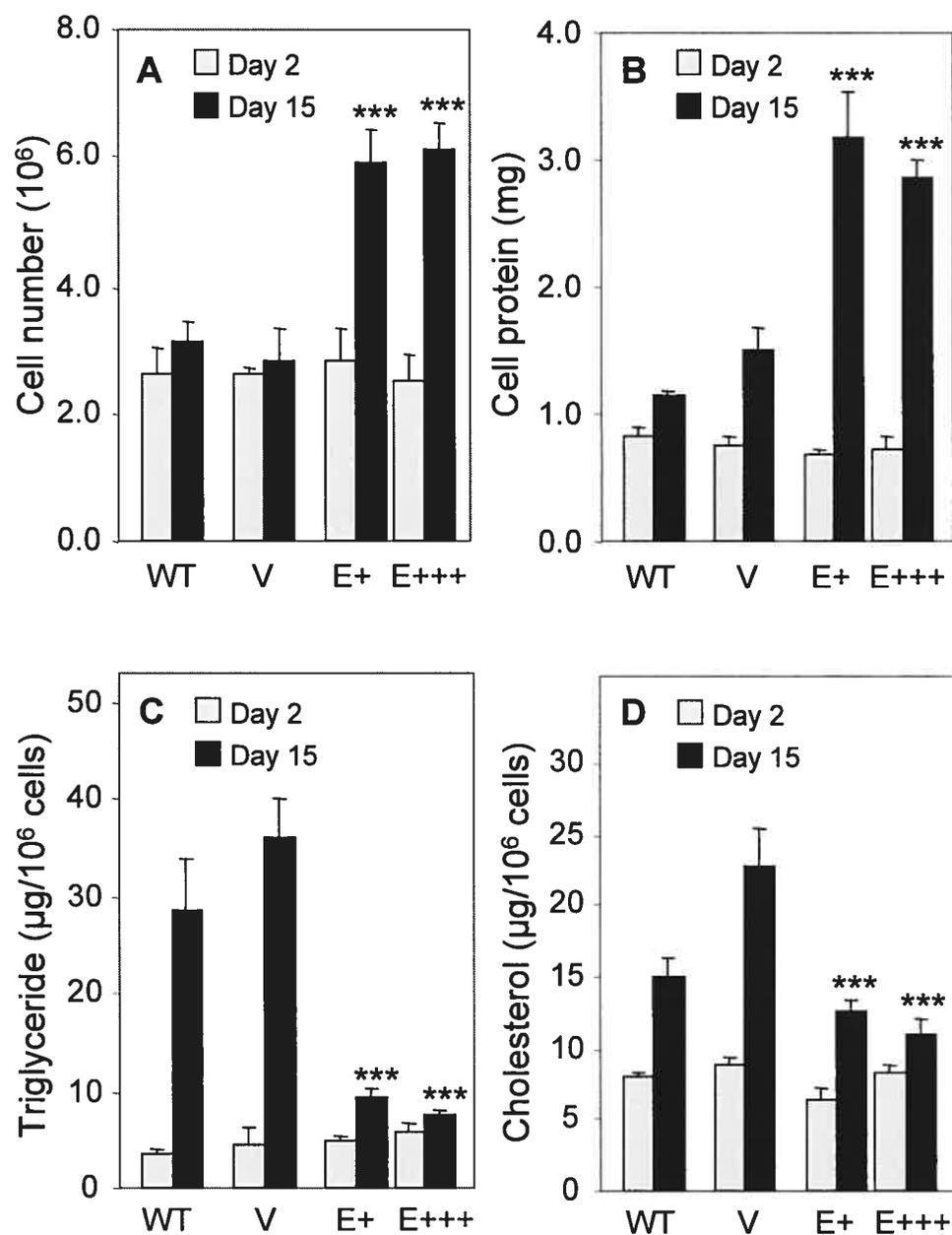


Figure 6

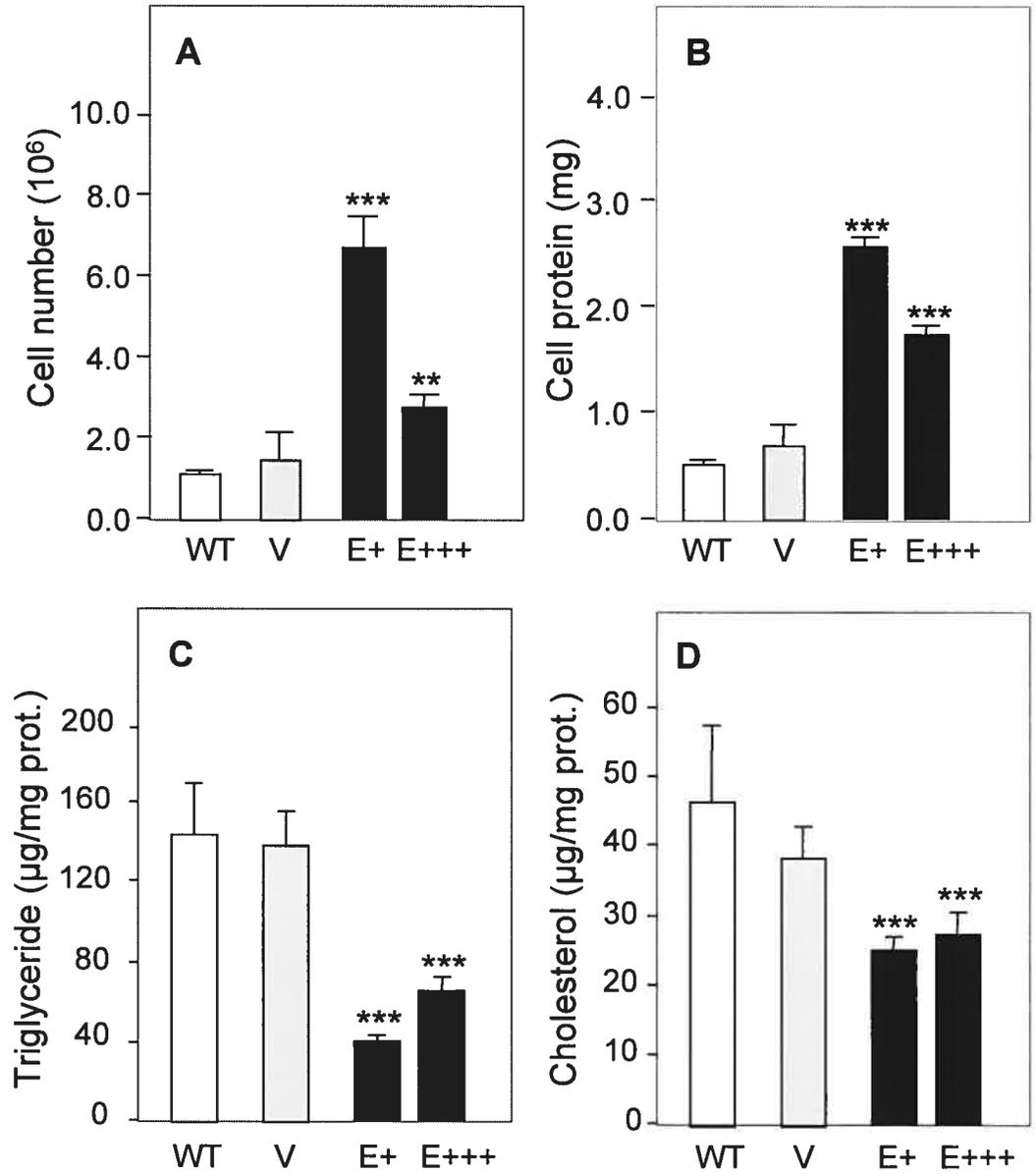


Figure 7

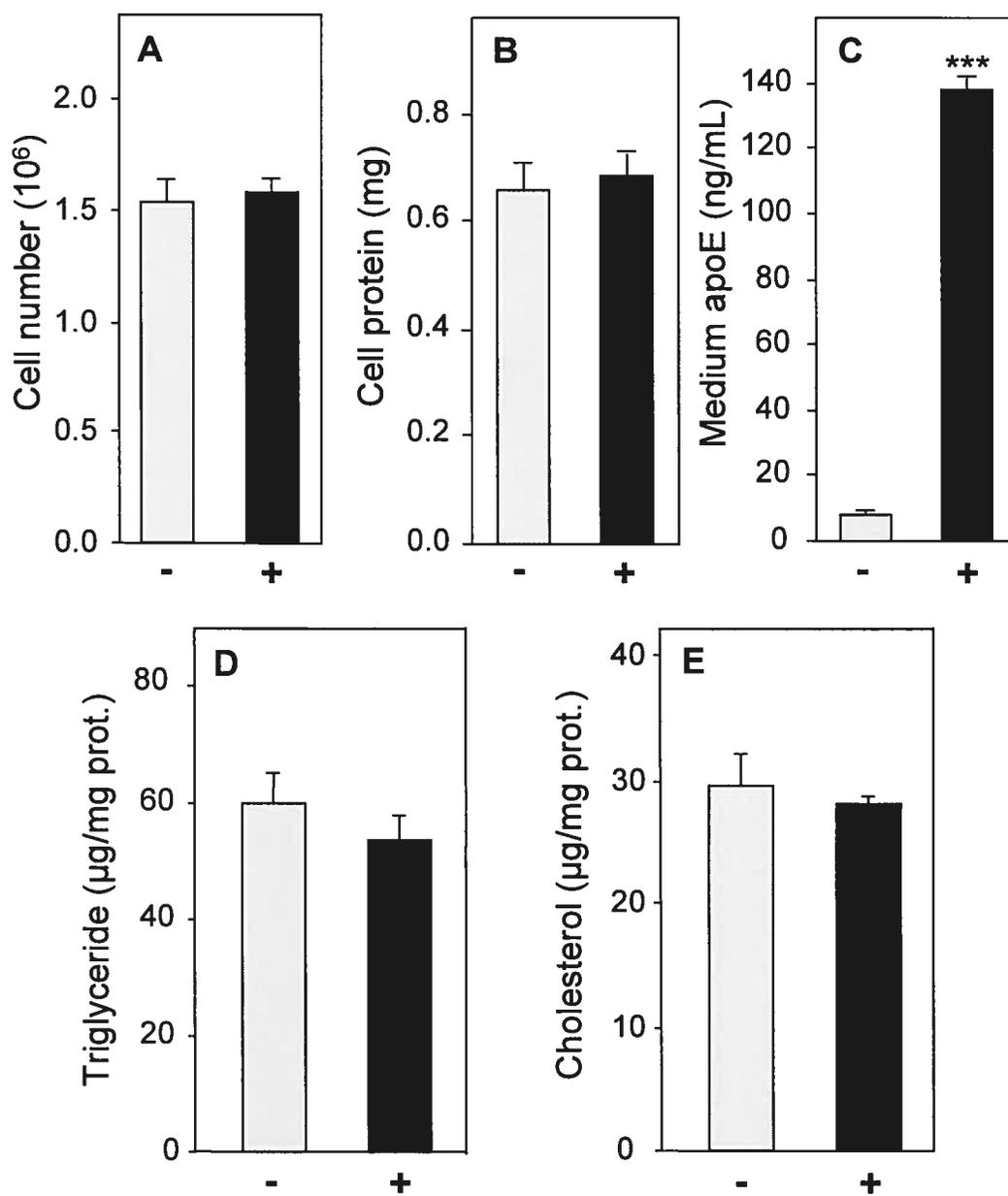


Figure 8

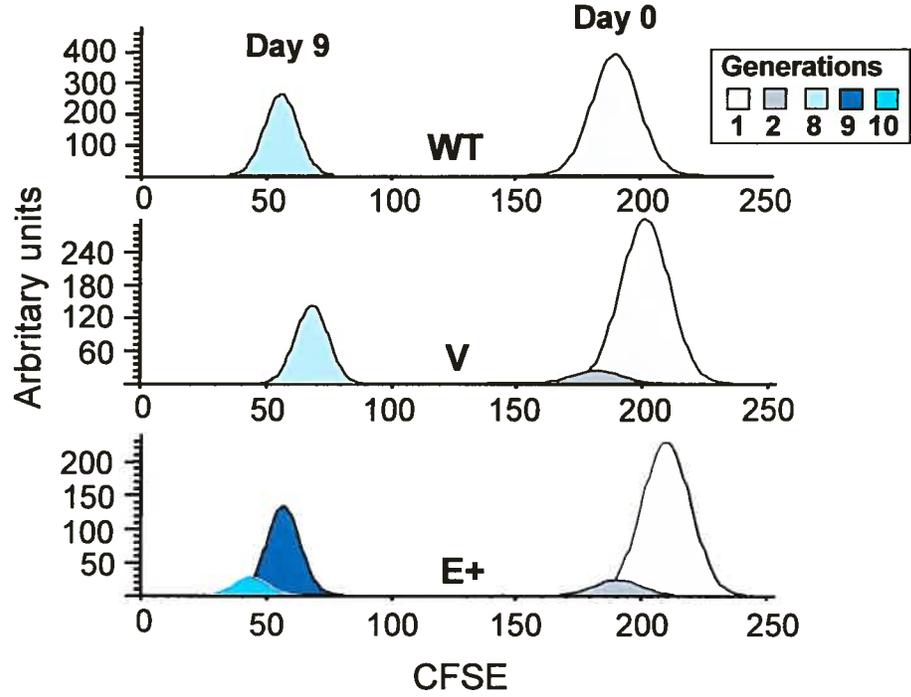
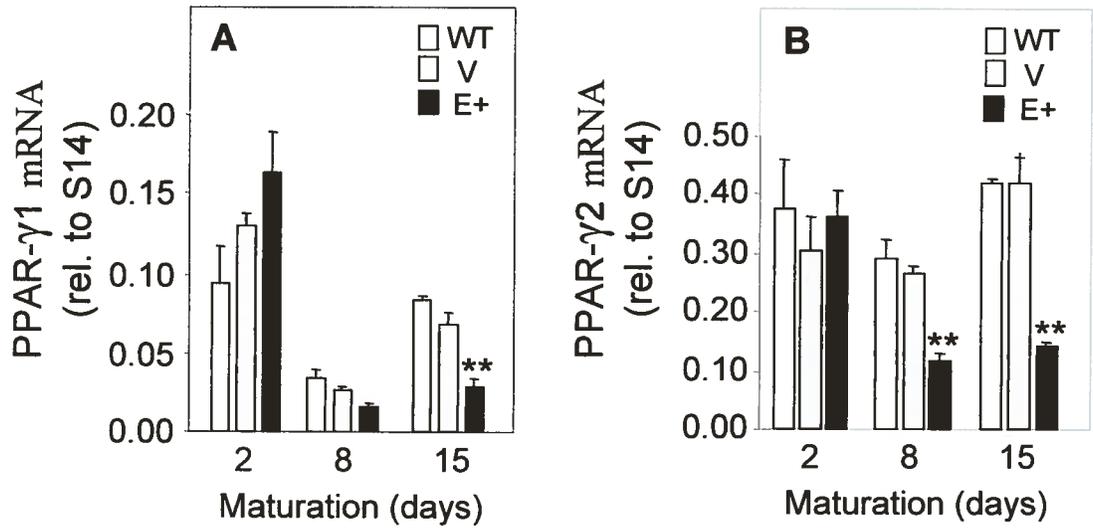


Figure 9



## **IV - Effets d'une surexpression stable de l'apolipoprotéine E sur la division cellulaire, le métabolisme des lipides et la régulation génique des adipocytes humains.**

### **1. Introduction**

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que la surexpression stable de l'apolipoprotéine E a entraîné une hausse de la croissance cellulaire (vitesse de division cellulaire) et une réduction du niveau de triglycérides et de cholestérol cellulaires. Une baisse de l'expression de PPAR- $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2, de même que SCD1 a été décelée, suggérant une différenciation terminale et une maturation déficientes dans les transfectants apoE.

Dans le présent chapitre, nous présentons les résultats d'une analyse plus approfondie de la croissance cellulaire et du métabolisme des lipides. Dans l'optique de caractériser davantage le rôle de l'apoE au sein du tissu adipeux, l'expression de certains gènes importants dans l'épuration des lipoprotéines a également été examinée. Plus spécifiquement, l'effet de l'apoE sur l'arrêt de croissance et les phases du cycle cellulaire des cellules SW872 a été étudié. De plus, le rôle des acides gras dans la synthèse lipidique des transfectants apoE et finalement, le niveau d'expression du VLDLR et du LDLR a été analysé.

### **2. Matériel et méthodes**

#### **2.1 Culture Cellulaire**

Les cellules SW872 (ATCC) ont été cultivées dans un incubateur humidifié (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) dans du *Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose* et du milieu F12 (3:1, v/v) (DMEM-F12) additionné de NaHCO<sub>3</sub> (3,7 g/L), d'acides aminés non-essentiels (100  $\mu$ M), de pénicilline (100 U/mL), de streptomycine (100  $\mu$ g/mL) et de 10% sérum bovin foetal (FBS). Les

cellules ( $0,5-1,0 \times 10^6$ ) ont été cultivées dans des plaques de 6 puits et le milieu de culture (2 mL) a été changé tous les 2 jours.

## 2.2 Transfection

Les cellules SW872 ont été transfectées avec le vecteur pCDNA3 vide et pCDNA3-apoE3 tel que décrit au chap. III. En résumé, les cellules SW872 ont été transfectées de façon stable avec l'apoE3 à l'aide de la lipofectamine (Invitrogen). Des cellules ayant atteint 70% de confluence ont été lavées à trois reprises avec du milieu DMEM. Les cellules ont été exposées à 5 mL de DMEM et 5 mL de complexe ADN/lipofectamine pendant trois heures à 37°C. Ensuite, 10 mL de DMEM contenant cette fois 10% de sérum ont été ajoutés. Après trois jours de culture cellulaire, les cellules ont été transférées dans un milieu de sélection contenant de l'antibiotique généticine (0,6 mg/mL, Invitrogen). Après une semaine de culture cellulaire, les cellules résistantes qui avaient incorporé une ou plusieurs copies du vecteur pCDNA3 ou pCDNA3-apoE3 ont formé quelques colonies de cellules filles. Les différentes colonies ont été isolées, puis cultivées dans un milieu de maintien (0,3 mg néomycine/mL) avant d'être caractérisées par *ELISA*.

## 2.3 Cycle cellulaire

Afin de synchroniser les cellules en phase G<sub>1</sub>, les différentes lignées cellulaires ont été cultivées en l'absence de sérum 24 heures avant le début de l'expérimentation. Les cellules ont été ensuite cultivées en présence de sérum et prélevées à plusieurs intervalles de temps.  $0,7-1,0 \times 10^6$  cellules ont été resuspendues dans du tampon modifié Krishan (*sodium citrate* (0,1%), NP-40 (0,3%), iodure de propidium (0,05 mg/mL) et de la *Rnase A* (0,02 mg/mL). Les cellules ont été incubées 30 minutes à 4°C. Par après, les tubes ont été centrifugés pendant 5 minutes à 200g et à 4°C. Le culot a été resuspendu dans du tampon Krishan. Le contenu du tube a été par la suite passé au travers d'une aiguille (26,5g) afin de détruire la structure des noyaux cellulaires. Les échantillons ont été analysés par cytométrie en flux

sur le FACScan (Becton Dickinson) et le logiciel Cell Quest Pro. L'analyse finale des résultats a été faite à l'aide du logiciel Mod Fit.

#### **2.4 Coloration des cellules au Hoechst**

Les cellules ont été lavées à deux reprises avec du PBS 1X. Une solution de Hoechst (1 mg/mL) [1 mg de Hoechst et 1 ml d'eau filtré] a été ajoutée afin de distinguer les cellules vivantes. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 15 minutes et ensuite lavées avec du PBS 1X. Finalement, l'iodure de propidium (50 g/mL) a été ajouté et les cellules ont été visualisées et photographiées sous un microscope à fluorescence (objectif 32 X)

#### **2.5 Extraction et quantification de l'ARN messenger**

L'ARN a été extrait selon le protocole du fabricant à l'aide du Trizol© obtenu d'Invitrogen (Burlington, Ontario) (chap. III). Les ARN totaux ont été quantifiés avec un spectrophotomètre et l'ADNc a été synthétisé par transcription inverse (Invitrogen, Burlington, Ontario). L'ADNc a ensuite été amplifié par PCR en temps réel avec le *SYBR green mastermix* acheté chez Qiagen (Mississauga, Ontario). Les amorces pour le S14 (une protéine ribosomale humaine utilisée comme standard) et les autres gènes ont été obtenues d'Invitrogen (Burlington, Ontario).

#### **2.6 Extraction lipidique**

Les lipides cellulaires ont été extraits en effectuant trois incubations d'une heure avec de l'hexane/isopropanol (3:2, v/v), sous agitation douce [212]. Les lipides recueillis ont été centrifugés à 200g. Les surnageants ont été transférés dans une nouvelle série de tubes et évaporés sous un jet d'azote dans un bain-marie à 37°C.

Les lipides ont été quantifiés par réaction enzymatique de *Roche Diagnostics* (Indianapolis, IN). La lecture des densités optiques a été effectuée à 500 nm pour le cholestérol et à 505 nm pour les triglycérides.

## 2.7 Extraction et quantification des protéines

Le niveau d'apolipoprotéine E cellulaire et sécrétée dans le milieu a été déterminé par la méthode *ELISA* (Chap. III) (210). Une analyse régulière de la sécrétion d'apoE dans les lignées cellulaires surexprimant l'apoE n'a pas révélé de changement relatif au degré de surexpression de la protéine. La détermination des protéines cellulaires totales a été effectuée en lavant les cellules deux fois avec du PBS. Les cellules ont été ensuite solubilisées dans du NaOH (0,1 M). Les protéines ont été mesurées par la technique de Lowry et al. en utilisant l'albumine comme standard (211).

## 2.8 Essais avec l'oléate radioactif

L'oléate radioactif [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] (57,4 mCi/mmol; Amersham) a été séché sous un jet d'azote, puis redissout dans de l'éthanol 95%. L'éthanol a été asséché sous un jet d'azote et le tout a été redissout dans une solution de NaCl 0,9%. L'oléate froid a été préparé à partir d'une solution d'albumine dépourvu d'acides gras [20% dans 0,9% de NaCl (2g/10 mL)] et d'une solution d'oléate de sodium (6,086 mM dans la solution d'albumine) [oléate froid; 9,129  $\mu\text{mol}$ , oléate radioactif; 0,871  $\mu\text{mol}$ ].

Les cellules WT, V et E+ ont été cultivées dans des plaques de six puits pendant 8 jours avant l'expérimentation. Le jour de l'expérience, les cellules ont été exposées à un milieu *DMEM High glucose-F12* (3:1, v/v) sans sérum et traitées avec de [ $^{14}\text{C}$ ]-oléate-BSA (100  $\mu\text{M}$ , ratio 1:2) pendant une période variant de 30 minutes à 2 heures à 37°C. À la fin de chaque temps d'incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec de la phlorétine (200  $\mu\text{M}$ )/BSA (0,1%) pour empêcher l'efflux d'acides gras par les cellules SW872 et permettre de mesurer uniquement les acides gras intracellulaires et non l'oléate lié aux membranes plasmiques (224). Un aliquot des lipides cellulaires a été déposé dans des vials à scintillation pour le comptage de la radioactivité.

## 2.9 Analyse statistique

Les moyennes des échantillons sont exprimées  $\pm$  l'erreur standard (SE) et ont été comparées avec un test de t de Student.

## 3. Résultats

Afin de vérifier plus en détail l'effet de l'apoE sur la croissance des cellules SW872, les cellules WT, V, E+, E++ et E+++ ont été cultivées sur une période de trois semaines en présence de sérum. Au jour 1, la croissance de chaque lignée cellulaire a été très semblable. Cependant, après 4 jours de culture, il y a eu une augmentation prononcée de la croissance cellulaire, accompagnée par une plus grande proportion de cellules en phase G<sub>2</sub>/M pour les surexprimants apoE (Fig. 10A et C). De plus, un plateau désignant l'arrêt de croissance cellulaire est survenu plus tardivement pour les transfectants apoE que pour les cellules témoins (Fig. 10C). L'effet de l'apoE ne semble pas être dose-dépendant, puisque le plus faible surexprimant avait le plus grand impact sur la croissance cellulaire (Fig. 10A).

La croissance des cellules a également été visualisée par microscopie. Les cellules WT, V et E+ ont été cultivées pendant 2 ou 15 jours en présence de sérum avant d'être exposées au Hoechst et à l'iodure de propidium. Le Hoechst permet de marquer le noyau des cellules vivantes (bleu), alors que l'iodure de propidium marque le noyau des cellules mortes (rouge). Après 2 jours, aucune différence n'a été observée entre les différentes lignées cellulaires alors qu'il y a eu une plus grande accumulation de cellules E+ après 15 jours de maturation. De plus, aucun changement dans la proportion de cellules vivantes et de cellules mortes n'a été observé en microscopie et en cytométrie de flux entre les différentes lignées (non montré).

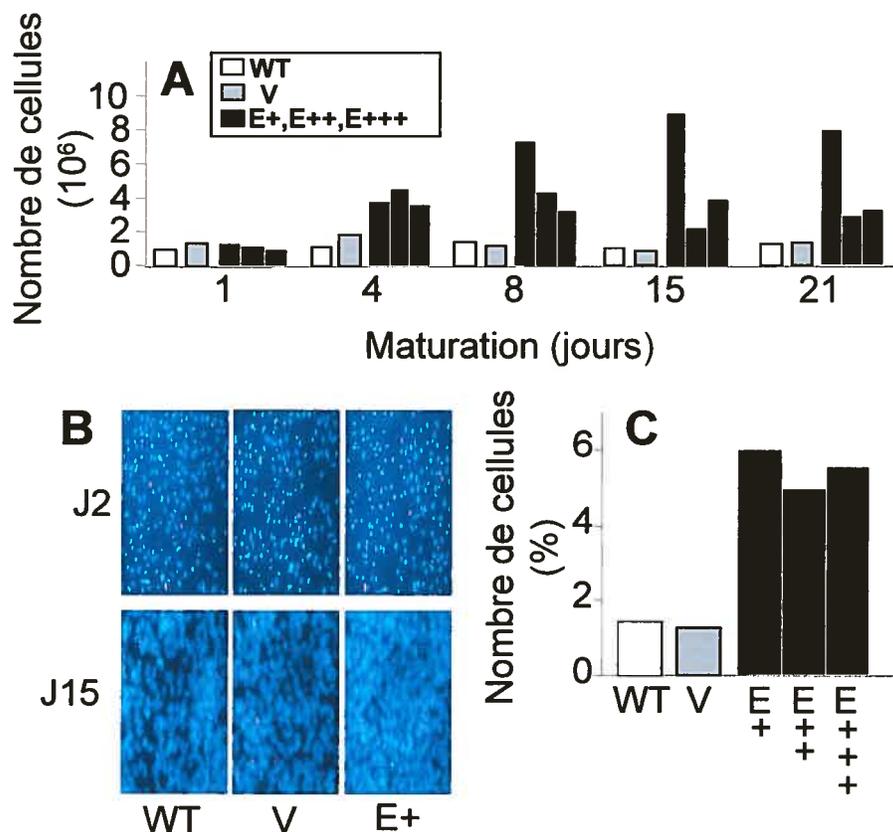


Figure 10. **Analyse de la croissance cellulaire des cellules surexprimant l'apoE au cours de la maturation.** Les cellules ont été incubées pour une période de 1 à 21 jours en présence de 10% FBS. La croissance cellulaire a été déterminée par (A) compte cellulaire, (B) par analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux à jour 4 et (C) par la visualisation des cellules au microscope à fluorescence (32X) aux jours 2 et 15 (les cellules vivantes étant bleues et les cellules mortes étant rouge).

Les acides gras sont des précurseurs de la synthèse des triglycérides, des phospholipides et du cholestérol estérifié. Il a été montré au chap. III que les transfectants apoE accumulaient moins de lipides cellulaires et ce, indépendamment de la présence des lipoprotéines dans le milieu de culture. Les cellules WT, V, E+, E++ et E+++ ont été cultivées en présence d'un excès d'acides gras oléate pendant 15 jours afin de vérifier l'impact d'un surplus d'acides gras sur l'accumulation de lipides cellulaires. Une hausse de la croissance cellulaire a été décelée chez les transfectants apoE (Fig. 11A et B).

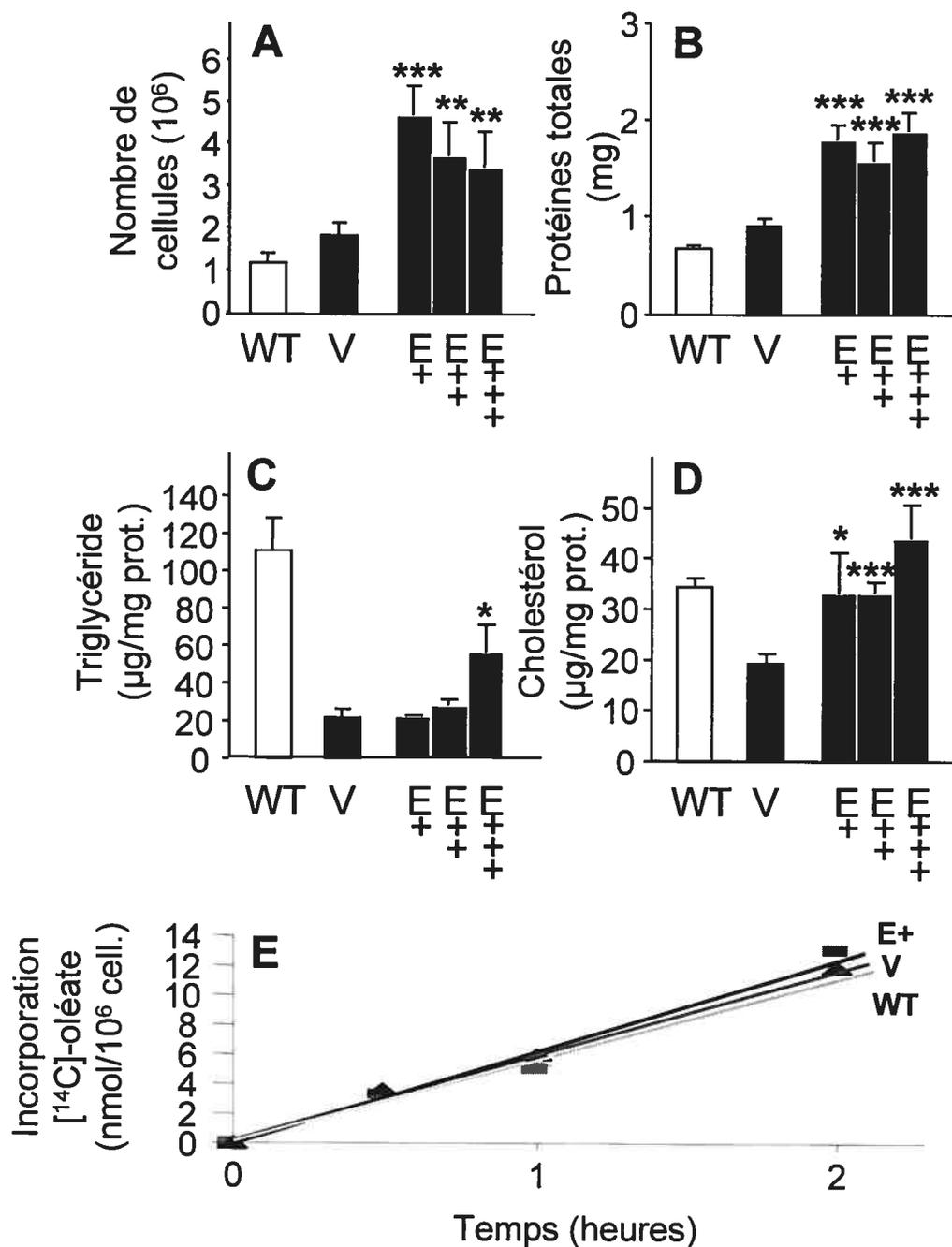


Figure 11. Effet d'une supplémentation en acides gras sur le métabolisme lipidique des surexprimants apoE. Les cellules ont été incubées pendant 15 jours en présence de 10% FBS et d'un excès d'oléate-BSA (100  $\mu\text{M}$ , ratio 2:1). La croissance cellulaire a été déterminée par (A) le nombre de cellules et (B) les protéines totales. De plus, le niveau de (C) triglycérides et de (D) cholestérol a été analysé. À jour 8, les cellules WT, V et E+ ont été incubées en absence de sérum et en présence d'oléate radioactif pour une période de 30 minutes à 2 heures afin de vérifier (E) l'incorporation d'acides gras. Significativement différent de la lignée vecteur (V): \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  et \*\*\* $P < 0,001$ .

Le contenu en triglycérides était comparable entre les surexprimant apoE et le vecteur seul, alors qu'une hausse significative de triglycérides a été observée dans les cellules E+++ (Fig. 11C). De plus, une augmentation de la quantité de cholestérol cellulaire a été décelée dans les transfectants apoE en comparaison avec les cellules V (Fig. 11D). Pour une raison inexplicée, les cellules WT ont accumulé beaucoup plus de lipides lors de cette expérience. Les cellules WT, V et E+ ont été ensuite cultivées pendant 8 jours, puis exposées de 30 minutes à 2 heures à de l'oléate radioactif afin de vérifier l'incorporation d'acides gras dans ces cellules. Aucune différence n'a été décelée entre les différentes lignées cellulaires (Fig. 11E).

Dans le but de comprendre le mécanisme par lequel l'apoE affecte l'accumulation de lipides, une analyse de l'expression de certains récepteurs membranaires impliqués dans la capture des lipoprotéines a été effectuée. Après 15 jours de maturation en présence de sérum contenant des lipoprotéines, une diminution de l'ARNm LDLR chez les cellules E+ (-47%,  $P > 0.05$ ) et E++ (-27%,  $P < 0.01$ ), et une réduction de l'ARNm VLDLR chez les cellules E+ (-44%,  $P < 0.01$ ), E++ (-45%,  $P < 0.05$ ) et E+++ (-21%,  $P < 0.05$ ) a été trouvée (Tableau II).

L'expression de ces gènes a également été investiguée lorsque les cellules étaient cultivées sur une période de 15 jours en absence de lipoprotéines. Une baisse de l'ARNm LDLR chez les cellules E+ (-60%,  $P < 0.001$ ) et E++ (-55%,  $P < 0.001$ ) a été observée, tandis qu'aucune diminution de l'ARNm VLDLR n'a été perçue chez les trois transfectants apoE. La présence de lipoprotéines n'a pas eu d'impact sur la synthèse d'ARNm LDLR et VLDLR dans les cellules E+++ (Tableau II).

Tableau II: Effet d'une surexpression stable de l'apoE sur les niveaux d'ARNm LDLR et VLDLR.

<i>Lignées cellulaires</i>	LDLR		VLDLR	
	FBS	LPDS	FBS	LPDS
V	0,647 ± 0,086	0,475 ± 0,039	0,0117 ± 0,0006	0,0083 ± 0,0011
E+	0,3418 ± 0,0149*	0,188 ± 0,005***	0,0066 ± 0,0006**	0,0104 ± 0,0020
E++	0,248 ± 0,023**	0,214 ± 0,015***	0,0064 ± 0,0011*	0,0100 ± 0,0020
E+++	0,471 ± 0,035	0,504 ± 0,038	0,0092 ± 0,0006*	0,0084 ± 0,0011

Les différentes lignées cellulaires ont été incubées pendant 15 jours en présence (FBS) ou en absence (LPDS) de lipoprotéines. Les résultats représentent le ratio d'ARNm VLDLR ou LDLR par rapport au S14 pour 4 puits ( $\pm$  SE). Significativement différent de la lignée vecteur (V): \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  et \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4. Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que 1) l'apoE affecte l'arrêt de croissance des cellules, que 2) la supplémentation en acides gras permet de restaurer les niveaux de lipides cellulaires dans les transfectants apoE et que 3) l'expression du VLDLR et du LDLR est régulé à la baisse dans les surexprimants apoE.

L'analyse de la maturation des transfectants apoE sur une période de trois semaines a permis de mettre en évidence un effet précoce et prolongé de l'apoE sur la croissance cellulaire. En effet, le nombre de cellules était doublé et une plus grande proportion de celles-ci se retrouvait en phase G<sub>2</sub>/M (Fig. 10A). De plus, la croissance cellulaire atteignait un plateau plus tardivement pour les transfectants apoE. Une diminution de l'expression d'ARNm PPAR- $\gamma$  dans les transfectants apoE pourrait causer un retard dans l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, il a été démontré que PPAR- $\gamma$  permettait l'arrêt de croissance des adipocytes en inhibant l'activité de la liaison à l'ADN

et l'activité transcriptionnelle du complexe E2F/DP, empêchant la synthèse des gènes nécessaires à l'entrée en phase S du cycle cellulaire (216).

Par ailleurs, Morrison et Farmer ont démontré qu'il existait un lien entre l'arrêt de croissance et la différenciation cellulaire pendant l'adipogénèse, et que PPAR- $\gamma$  pourrait être le médiateur de cet effet (215). Les données recueillies suite à la maturation des cellules en présence ou en absence de lipoprotéines suggèrent un effet de l'apoE cellulaire sur la synthèse de lipides qui pourrait être expliqué par la réduction de l'expression de PPAR- $\gamma$  (chap. III). PPAR- $\gamma$  est un facteur de transcription qui régule plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du glucose (voir section 3.3.2) et les travaux de Tamori et al. ont montré que l'inactivation de PPAR- $\gamma$  causait une réduction de l'incorporation d'acides gras dans les adipocytes (217). Une diminution de l'expression de PPAR- $\gamma$  dans les surexprimants apoE pourrait par conséquent réduire l'entrée d'acides gras dans les cellules SW872 et expliquer la diminution du niveau de triglycérides et de cholestérol.

Les expériences de maturation en présence d'un excès d'acides gras ont montré que le niveau de triglycérides était identique entre les cellules V et E+/E++, alors que la lignée E+++ était plus apte à accumuler les triglycérides (Fig. 11C). De plus, une hausse accrue du cholestérol total a été décelée chez les trois lignées apoE (Fig. 11D). Ces données suggèrent une plus grande accumulation d'acides gras dans les surexprimants apoE, ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de la synthèse de triglycérides et du cholestérol. Cependant, l'incubation des cellules WT, V et E+ avec l'oléate radioactif n'a pas permis de trouver une différence dans l'incorporation d'acides gras entre ces lignées cellulaires (Fig. 11E).

L'équilibre entre la synthèse et la captation des lipides est régi par la présence ou l'absence de lipides dans le milieu. Chez les cellules SW872, il a été constaté que le niveau de lipides n'était pas altéré suite à la maturation

de ces cellules en absence de lipoprotéines, ce qui pouvait être expliqué par une hausse de la lipogénèse endogène (14). Chez les surexprimants apoE ce mécanisme semble inefficace, puisque même en absence de lipoprotéines, on observe une diminution de lipides cellulaires. L'incorporation d'acides gras étant identique chez les trois lignées (WT, V, E), cela suggère un effet inhibiteur de l'apoE sur la lipogénèse ou un effet stimulateur sur la lipolyse. Il a été montré également qu'une inactivation de PPAR- $\gamma$  causait une augmentation de la lipolyse dans les adipocytes (217). Par contre, quand les cellules sont amenées à maturation en présence d'un excès d'acides gras, le niveau de triglycérides et de cholestérol est identique ou supérieur. Il est possible que les surexprimants apoE incorporent une moins grande quantité d'acides gras que les autres lignées à cause d'une déficience en acides gras dans le milieu de culture. Les acides gras proviennent majoritairement de l'hydrolyse des triglycérides à l'intérieur des VLDL, par la LPL (23). Sachant que PPAR- $\gamma$  permet l'activation de l'expression de la LPL (157), les surexprimants apoE (niveau réduit de PPAR- $\gamma$ ) pourraient réguler à la baisse la LPL et ainsi, diminuer la présence d'acides gras dans le milieu extracellulaire. La supplémentation en acides gras, de même que l'absence de lipoprotéines lors de l'expérience sur l'incorporation d'acides gras (Fig. 11E) n'aurait donc pu permettre de détecter cet effet possible de l'apoE.

L'internalisation des lipoprotéines riches en triglycérides constitue un autre mécanisme important dans le développement des adipocytes. Il a été démontré que l'internalisation des VLDL par les adipocytes permettait l'accumulation de lipides (225). Pour cette raison, nous avons étudié l'expression de deux récepteurs membranaires impliqués dans la capture de lipoprotéines soient le VLDLR et le LDLR (18-20). L'incubation des cellules E+ et E+++ pendant 15 jours en présence de sérum a montré une baisse de l'accumulation de lipides cellulaires (chap. III). Une régulation à la baisse du LDLR et/ou du VLDLR pourrait par conséquent expliquer la réduction du

niveau lipidique observée chez les transfectants apoE. Une diminution de l'ARNm LDLR pour les cellules E+ et E++, de même qu'une baisse d'ARNm VLDLR pour les cellules E+, E++ et E+++ a été constaté (Tableau I). Ces données suggèrent l'hypothèse que la liaison des VLDL aux VLDLR ou aux LDLR pourrait être un mécanisme engendrant l'accumulation de lipides dans les adipocytes. D'ailleurs, les souris déficientes en VLDLR ont une réduction de poids et une diminution de l'incorporation d'acides gras dans le tissu adipeux (226).

L'effet de l'absence de lipoprotéines sur l'expression de ces deux récepteurs a également été investigué. Le niveau d'ARNm LDLR a diminué dans les cellules E+ et E++, alors qu'aucune baisse d'ARNm VLDLR n'a été remarquée dans les transfectants apoE (Tableau II). Il se peut que l'expression à la baisse de VLDLR et de LDLR soit reliée à un stade plus précoce de maturation pour les transfectants apoE. Il a été montré que les niveaux d'ARNm et de protéine VLDLR étaient augmentés lors de la différenciation des adipocytes (227). Par ailleurs, il n'est pas exclu que la diminution de l'expression du VLDLR et du LDLR puisse contribuer en partie à la réduction du niveau de lipides chez les surexprimants apoE cultivés en présence de lipoprotéines (chap. III; Fig. 5).

Il est essentiel de confirmer l'ensemble de ces résultats afin de mieux comprendre le rôle de l'apoE sur l'arrêt de croissance cellulaire et le cycle cellulaire, de même que l'influence des acides gras dans l'accumulation de lipides chez les cellules surexprimant l'apoE.

Nos résultats mettent en évidence une division cellulaire accélérée (chap. III) et prolongée (chap. IV) pour les surexprimants apoE. Il serait intéressant de vérifier l'expression des cyclines A, B, D<sub>1</sub> et E, ainsi que d'autres gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire pendant des études de maturation. Les acides gras jouent un rôle crucial dans le

développement des adipocytes en permettant la synthèse principalement des triglycérides, des phospholipides et du cholestérol estérifié. Une diminution d'acides gras dans le milieu des transfectants apoE pourrait par surcroît expliquer la réduction de l'accumulation de lipides cellulaires. Il serait donc important de quantifier la lipolyse des VLDL, de même que celle des triglycérides cellulaires. De plus, il serait intéressant de vérifier l'expression de la lipase hormono-sensible (HSL). Cette dernière est une enzyme qui hydrolyse les triglycérides, les diglycérides, les monoglycérides et le cholestérol estérifié à l'intérieur des adipocytes (228). Finalement, une analyse de l'expression d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des lipides pourrait être effectuée. Parmi les gènes susceptibles d'être régulés, il y a la LPL et les *sterol regulatory element-binding proteins 1c et 2* (SREBP) qui favorisent la synthèse lipidique (surtout le cholestérol) et l'activation de plusieurs gènes impliqués dans l'homéostasie des lipides (229).

## V - Effets d'une surexpression stable de l'apolipoprotéine E sur l'incorporation d'acides gras et le métabolisme lipidique des hépatocytes humains.

### 1. Introduction

L'apolipoprotéine E joue un rôle primordial dans l'épuration des lipoprotéines vers le foie en liant les HSPG et en agissant comme ligand pour divers récepteurs tels que le LDLR, le VLDLR, la LRP (18-20). Les souris et les humains dépourvus d'apoE possèdent des concentrations plasmatiques élevées en cholestérol, VLDL-cholestérol, triglycérides et en LDL-cholestérol (90;92). Des études ont dévoilé un rôle de l'apoE au niveau de la production et de la sécrétion de VLDL dans le foie. Kuipers et al. ont montré que les souris apoE<sup>-/-</sup> produisaient 50% moins de VLDL que les souris témoins (94). À l'opposé, une hausse de la production de VLDL était décelée suite à l'ajout du transgène *APOE3* dans les souris déficientes en apoE (8). Plus spécifiquement, l'apoE permettrait d'augmenter la quantité de VLDL-TG produites et sécrétées par le foie (7). Cette augmentation peut à son tour contribuer au développement du tissu adipeux et de fait favoriser le processus menant à l'obésité (15).

La production des VLDL hépatiques est également régulée par la présence d'acides gras. Une fois à l'intérieur des cellules, la majorité des acides gras sont estérifiés, puis entreposés dans le pool cytoplasmique de triglycérides (230). Une lipolyse des triglycérides suivie d'une réestérification des acides gras est l'étape préalable à la sécrétion des VLDL (230). L'addition d'oléate aux hépatocytes et aux cellules HepG2 entraîne d'ailleurs l'augmentation de la synthèse *in vitro* de VLDL-TG et de VLDL-apoB (231;232).

Le mécanisme de régulation de la synthèse et de la sécrétion des VLDL par l'apoE n'est pas bien compris. Afin d'étudier le rôle de l'apoE dans ce processus, des cellules d'hépatoblastome humain (HepG2), représentant

un bon modèle d'hépatocytes (233), ont été transfectées de façon stable avec l'apoE3. Plus précisément, ces cellules ont été exposées à un excès d'acides gras afin d'investiguer le rôle de l'apoE au niveau du métabolisme des acides gras. Notre hypothèse était que l'apoE pourrait favoriser l'entrée d'acides gras et permettre la fabrication des VLDL.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1 Culture cellulaire**

Les cellules HepG2 ont été acquises de l'*American Type Culture Collection* (Rockville, MD). Elles ont été maintenues dans un incubateur humidifié (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) et cultivées dans du DMEM faible en glucose acheté chez GIBCO (Grand Island, NY), additionné de NaHCO<sub>3</sub> (3,7 g/L), d'acides aminés non-essentiels (100 µM), de pénicilline (100 U/mL) et de streptomycine (100 µg/mL). Le milieu était complété avec du FBS de chez *Sigma* (St-Louis, MO) afin d'obtenir une concentration finale de 10%. Le milieu de culture a été changé à tous les 2 jours et les expériences ont été faites lorsque la confluence des cellules atteignait environ 85%.

### **2.2 Transfection**

Les cellules HepG2 transfectées avec le vecteur seul (V) et avec l'ADNc apoE3 (E+) proviennent du laboratoire du Dre Louise Brissette, à l'UQAM. La mise au point de ces transfectants a d'ailleurs été publiée récemment (234). En résumé, le vecteur pJS382 contenant la séquence complète de l'ADNc apoE3 a été digéré par l'enzyme *Xba*I. Un fragment de 1,2 kbp comportant l'ADNc apoE3 a été inséré dans le vecteur pRc/CMV préalablement digéré par *Xba*I. Les vecteurs pRc/CMV vide (V) et pRc/CMV-apoE3 (E+) ont été transfectés de façon stable dans les cellules HepG2. Contrairement aux cellules non transfectées (WT), les cellules V et E+ étaient cultivées en présence de l'antibiotique généticine d'*Invitrogen* (0,3 mg/ml).

### 2.3 Essais avec l'oléate radioactif

Les cellules WT, V et E+ ont été cultivées dans des plaques de six puits pendant environ 4 jours avant l'expérimentation. Le jour de l'expérience, les cellules ont été transférées dans du milieu DMEM faible en glucose sans sérum et traitées avec du [<sup>14</sup>C]-oléate-BSA (100 μM, ratio 1:2) pendant une période variant de 30 minutes à 6 heures à 4°C ou à 37°C [voir chap. IV, section 2.8]. À la fin de chaque temps d'incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec de la phlorétine (200 μM )/BSA (0,1%) pour empêcher l'efflux d'acides gras par les cellules HepG2 et permettre de mesurer uniquement les acides gras intracellulaires et non l'oléate lié à la membrane plasmique (224). Les lipides cellulaires et sécrétés ont été extraits selon le protocole décrit ci-dessous.

### 2.4 Extraction des lipides

Les lipides cellulaires ont été extraits en effectuant trois incubations d'une heure avec de l'hexane/isopropanol (3:2, v/v) sous agitation douce. Les lipides recueillis ont été centrifugés à 200g. Les surnageants ont été transférés dans une nouvelle série de tubes et évaporés sous un jet d'azote dans un bain marie à 37°C.

Le contenu total en lipides (Fig. 14A) a été quantifié par réactions enzymatiques (*Roche Diagnostics*, Indianapolis, IN). La lecture des densités optiques a été effectuée à 500 nm pour le cholestérol et à 505 nm pour les triglycérides. Les lipides cellulaires radioactifs ont été resuspendus dans 100 μL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v), puis déposés sur des plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) préalablement chauffées à 37°C pendant 30 minutes. Les plaques ont été éluées dans un mélange de solvant (éther de pétrole, diéthyléther, acide acétique glacial, 8:2:1) pendant environ 30 minutes et révélées à l'iode. Les différentes fractions de lipides ont été isolées, puis déposées dans des vials à scintillation pour le comptage de la radioactivité. Un aliquot des extraits lipidiques cellulaires ou du milieu a été transféré directement dans les vials à scintillation après l'extraction afin de

vérifier la quantité d'acides gras présents dans le milieu et à l'intérieur des cellules. Les lipides radioactifs sécrétés (TG) ont été extraits avec du chloroforme/méthanol (2:1, v/v). Les tubes ont été centrifugés 30 minutes à 200g. Le chloroforme contenant les lipides a été isolé et transféré dans une nouvelle série de tubes. Le solvant a été évaporé et les lipides ont été redissouts dans du chloroforme/méthanol (2:1, v/v) avant d'être déposés sur les plaques CCM.

### **2.5 Extraction et quantification des protéines**

Le niveau d'apolipoprotéine E sécrétée dans le milieu a été déterminé par *ELISA* (chap. III) (210). La détermination des protéines cellulaires totales s'est effectuée en lavant les cellules deux fois avec du PBS. Les cellules ont été solubilisées dans du NaOH (0,1 M) et les protéines mesurées par la technique de Lowry et al. en utilisant l'albumine comme standard (211).

### **2.6 Analyse statistique**

Les moyennes des échantillons sont exprimées  $\pm$  l'erreur standard (SE) et ont été comparées avec un test de t de Student.

## **3. Résultats**

La recherche du mécanisme par lequel l'apolipoprotéine E facilite une hausse de la production de VLDL-TG et de VLDL-apoB dans le foie s'est fait à partir d'hépatocytes humains HepG2. Des cellules HepG2 non transfectées (WT), transfectées avec le vecteur vide (V) et transfectées avec l'apoE (E+) ont été utilisées lors des différentes expériences. La lignée E+ utilisée au cours des expériences synthétisait environ 2,8 fois plus d'apoE cellulaire que les cellules WT et V (234).

L'hypothèse de départ était que l'apoE pourrait permettre d'augmenter l'incorporation d'acides gras dans le foie, ce qui favoriserait la synthèse des

triglycérides, des phospholipides et du cholestérol estérifié, puis la production et la sécrétion des VLDL hors des hépatocytes. Les cellules WT, V et E+ ont donc été incubées pendant 5 heures avec une concentration physiologique de [ $^{14}\text{C}$ ]-oléate-BSA (219). Une chute significative de triglycérides (-20%,  $P < 0.05$ ), de phospholipides (-45%,  $P < 0.001$ ) et d'oléate libre (-47%,  $P < 0.01$ ) a été observée à l'intérieur des cellules surexprimant l'apoE (Fig. 12). Le niveau de cholestérol estérifié n'était pas modifié (non montré).

Ces résultats ont suggéré une diminution de l'entrée d'acides gras dans les hépatocytes. C'est pourquoi, l'incorporation d'acides gras a été testée avec les différentes lignées cellulaires. L'étape préalable consistait à vérifier le modèle de l'incorporation d'acides gras à partir des cellules WT. Ces cellules ont été cultivées sur une période de 30 minutes à 6 heures à 4°C et 37°C en présence de [ $^{14}\text{C}$ ]-oléate-BSA. Cette opération avait pour but de vérifier le niveau d'apparition d'acides gras dans les cellules et par ce fait même, la disparition d'acides gras du milieu de culture. À la Figure 13A, une incorporation négligeable d'acides gras a été décelée à 4°C, ce qui est en accord avec le fait qu'à cette température, les mécanismes de transport actif via des transporteurs ou des récepteurs d'acides gras est déficient et la diffusion passive est ralentie (219). À 37°C par contre, une incorporation d'acides gras constante entre 30 minutes et 2 heures a été observée, puis il y a eu l'apparition d'un plateau dans les cellules WT (Fig. 13A). Il est également intéressant de souligner le synchronisme pratiquement parfait entre l'apparition et la disparition d'acides gras à chaque temps d'incubation des cellules que ce soit à 4°C ou à 37°C.

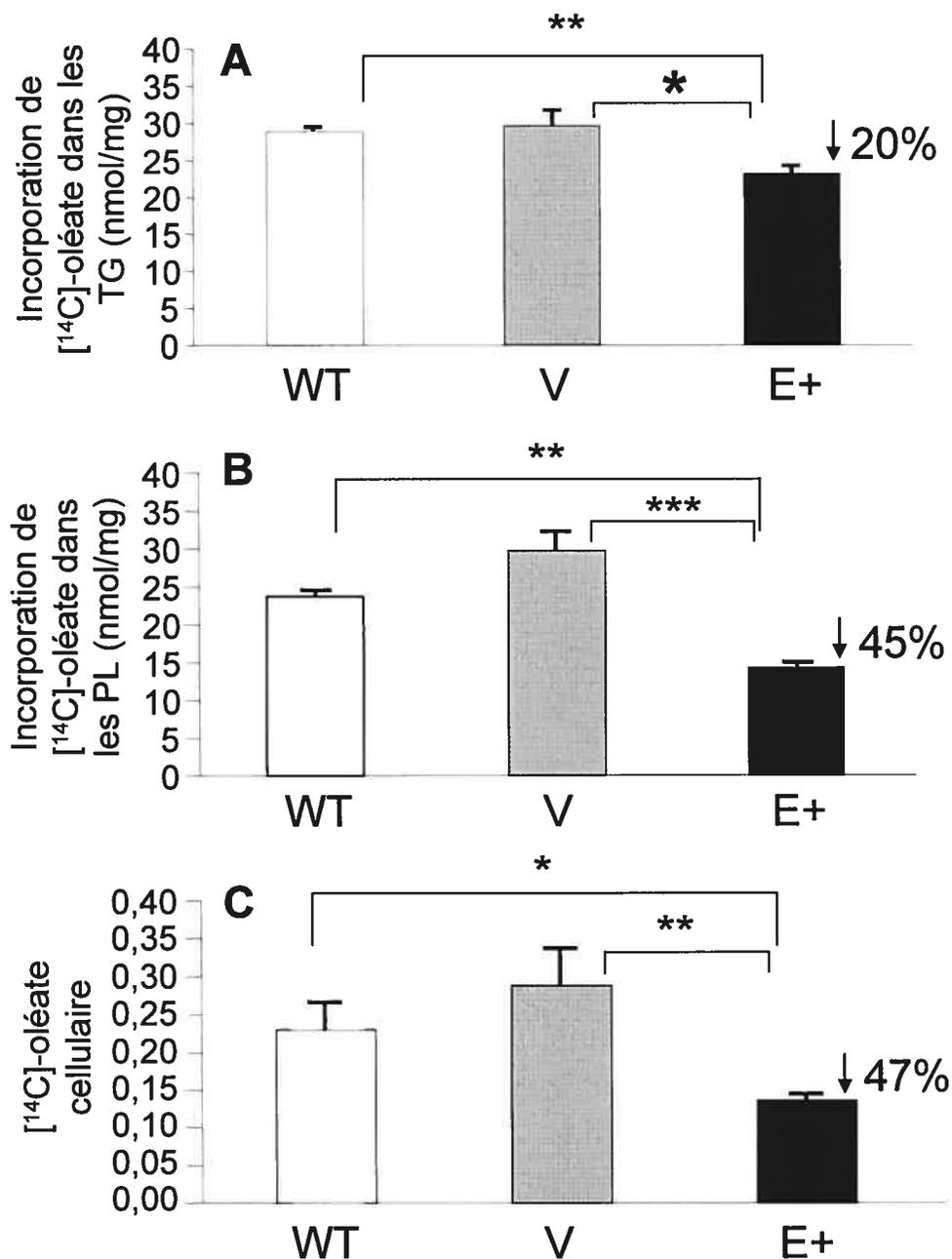


Figure 12. Diminution de la synthèse lipidique chez les cellules HepG2 surexprimant l'apoE Les cellules non transfectées (WT), transfectées avec le vecteur seul (V) et transfectées avec l'apoE (E+) ont été incubées 5 heures à 37°C avec du  $[^{14}\text{C}]$ -oléate-BSA (100  $\mu\text{M}$ , ratio 2:1). Les extraits lipidiques ont été séparés sur des plaques CCM et les fractions triglycérides (A-TG), phospholipides (B-PL) et oléate (C) ont été comptées. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SE pour 4 puits. Significatif par test de student : \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  et \*\*\* $P < 0,001$ .

Après la mise au point du modèle d'incorporation d'acides gras, les cellules WT, V et E+ ont été traitées de 30 minutes à 6 heures avec de [<sup>14</sup>C]-oléate-BSA. Une baisse de l'incorporation d'acides gras de 15% à 2 heures jusqu'à 31% après 6 heures a été observée au niveau des cellules E+. Il a été remarqué aussi que les cellules WT et V possédaient une cinétique d'incorporation d'acides gras très similaire, excluant un effet du vecteur d'expression sur l'incorporation d'acides gras dans ces cellules (Fig. 13B). Durant la même expérience, une hausse (180%) de la sécrétion de l'apoE a été trouvée dans les cellules E+ après 6 heures de traitement avec l'oléate (Figure 13C).

Le pool de triglycérides et de cholestérol des cellules WT et E+ traitées pendant 6 heures avec l'oléate radioactif a aussi été évalué afin de vérifier l'impact du traitement à l'oléate sur le contenu total en triglycérides et en cholestérol des cellules lors des expériences. Avant le traitement avec l'oléate, il n'y a pas eu de différence dans la composition en triglycérides et en cholestérol entre les cellules WT et E+ (non montré). Cependant, une réduction significative du cholestérol (-11%,  $P < 0.05$ ) et des triglycérides (-16%,  $P < 0.001$ ) a été trouvée au niveau des cellules E+. (Fig. 14A). Finalement, la sécrétion de triglycérides cellulaires a été évaluée en incubant pendant 5 heures les cellules WT, V et E+ avec de [<sup>14</sup>C]-oléate-BSA. Les résultats ont révélé une hausse d'environ 40% de la sécrétion de triglycérides cellulaires pour les cellules E+ (Fig. 14B).

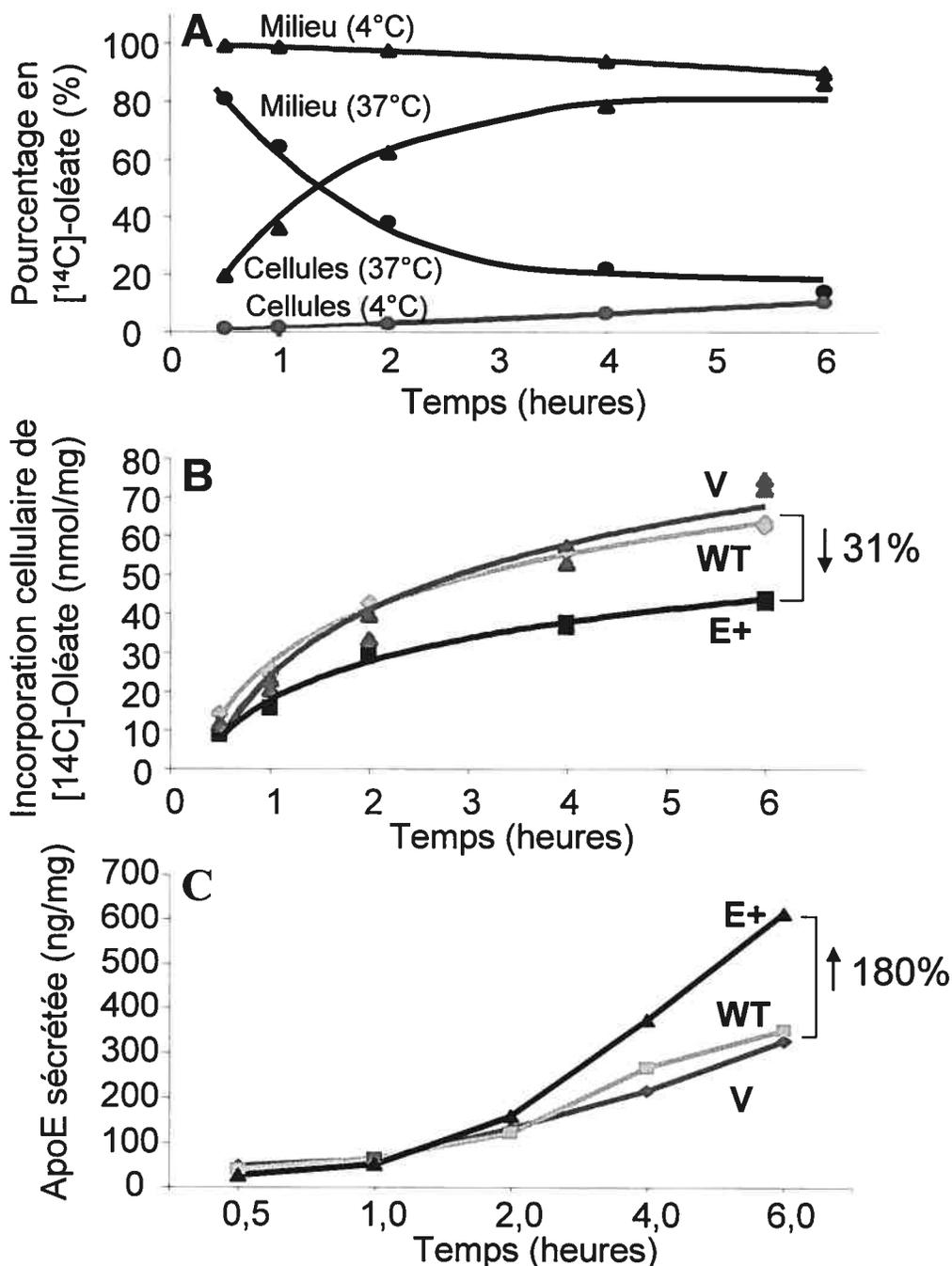


Figure 13. **Incorporation d'acides gras réduite chez les cellules HepG2 surexprimant l'apoE.** Les cellules WT, V et E+ ont été incubées de 30 minutes à 6 heures à 37°C ou à 4°C avec du  $[^{14}\text{C}]$ -oléate-BSA (100  $\mu\text{M}$ , ratio 2:1). La disparition de  $[^{14}\text{C}]$ -oléate-BSA dans le milieu et l'apparition dans les cellules WT a été analysée en comptant la radioactivité d'un aliquot de milieu et d'un extrait lipidique cellulaire à différents temps et températures (A). Les différents extraits lipidiques des cellules WT, V et E+ ont permis d'évaluer l'incorporation d'acides gras à chaque temps d'incubation (B) et le niveau d'apoE sécrétée a été mesuré par ELISA (n=2).

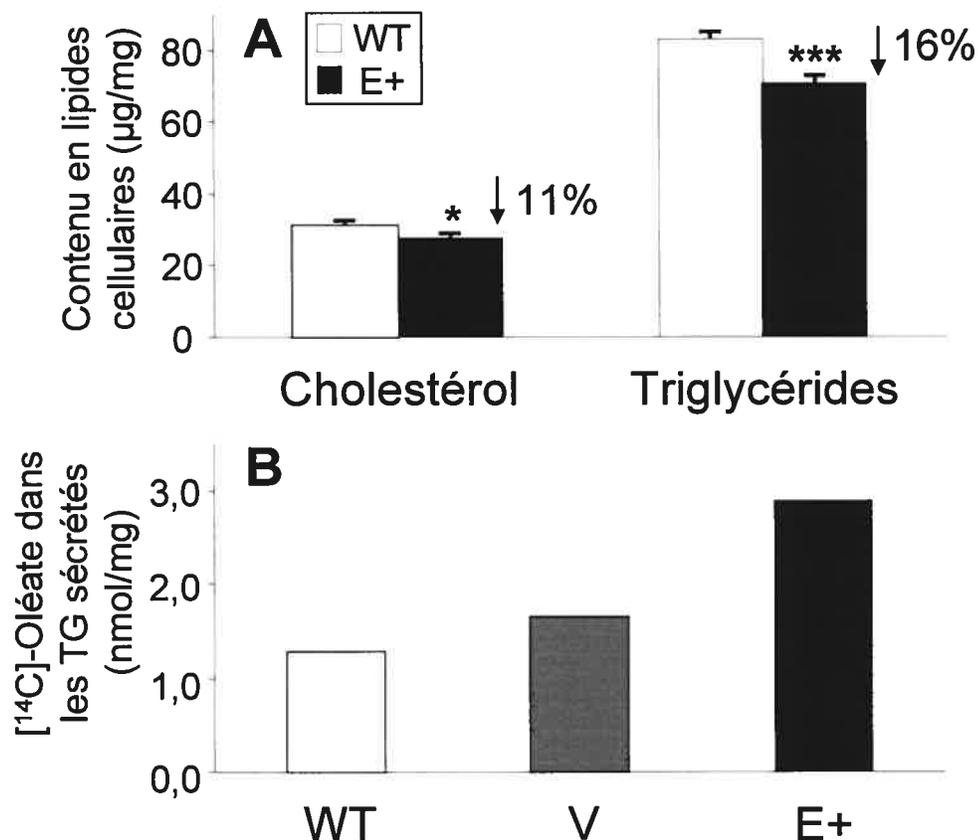


Figure 14. Réduction du contenu lipidique et hausse de la sécrétion de triglycérides chez les cellules HepG2 surexprimant l'apoE. Les cellules WT et E+ ont été incubées en présence de [<sup>14</sup>C]-oléate-BSA pendant 6 heures à 37°C (80% de confluence) et leur contenu en triglycérides et en cholestérol a été mesuré par essai enzymatique (A) (10 puits). La sécrétion de triglycérides radioactifs a été évaluée en incubant les cellules WT, V et E+ pendant 5 heures en présence de [<sup>14</sup>C]-oléate-BSA. Les extraits lipidiques du milieu ont été séparés sur des plaques CCM et la fraction correspondante aux triglycérides a été comptée. Les données représentent la moyenne ± SE pour 10 puits (A) et 2 puits (B). Significatif par test de student : \* $P < 0,05$  et \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4. Discussion

Les résultats de cette étude ont permis de montrer que la surexpression de l'apoE inhibe l'incorporation d'acides gras et engendre une réduction de triglycérides, de phospholipides et de cholestérol cellulaires dans les cellules HepG2. De plus, malgré cette diminution de lipides, la sécrétion de triglycérides est haussée chez les cellules surexprimant l'apoE (Fig. 15).

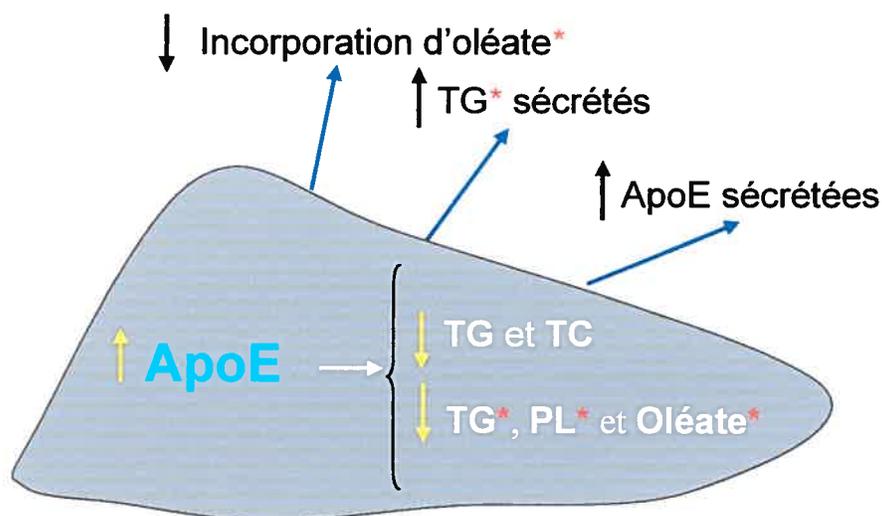


Figure 15. Effets globaux d'une surexpression de l'apoE sur l'incorporation d'acides gras et le métabolisme lipidique des cellules HepG2. [l'astérisque (\*) désigne les produits radioactifs].

Il a été montré que l'apoE, de même que l'oléate stimulaient la production et la sécrétion de VLDL-TG et de VLDL-apoB dans les hépatocytes (7;8;231;232;235). Notre hypothèse était qu'une hausse de la production d'apoE par les cellules HepG2 pouvait promouvoir l'accumulation d'acides gras dans les hépatocytes et favoriser la synthèse de triglycérides, de phospholipides et de cholestérol estérifié. Contrairement à notre hypothèse, une diminution de l'incorporation d'acides gras a été observée chez le transfectant apoE (Fig. 13B). Il n'existe pas de littérature scientifique qui mentionne un effet inhibiteur de l'apoE sur l'entrée d'acides gras à l'intérieur des hépatocytes. Au niveau des cellules HepG2, Lilly-Stauderman

et al. ont montré que 75% de l'apoE était sécrétée, 20% se localisait dans la cellule et 5% était associée à la membrane plasmique (236). Il se peut que la surexpression stable de l'apoE modifie la destination de l'apoE et la concentre davantage au niveau de la membrane plasmique. De cette façon, l'apoE pourrait nuire à l'activité de certains transporteurs ou récepteurs d'acides gras comme CD36, FAT ou FATPpm et ainsi diminuer l'entrée d'acides gras et la synthèse de lipides.

La quantification du contenu total en lipides cellulaires pour les cellules WT et E+ a permis de montrer d'une part que la diminution de la synthèse *de novo* des triglycérides (Fig. 12A) réduisait le niveau de triglycérides totaux et d'autre part que la réduction d'acides gras cellulaires était associée avec une chute significative du cholestérol total (Fig. 14A). Ces réductions semblent être causées par l'abondance de l'apoE chez les cellules E+ jumelée à l'ajout d'oléate, puisqu'avant le traitement, le niveau de triglycérides et de cholestérol dans les cellules WT et E+ étaient similaires (non montré).

Il a été également décelé que les cellules E+ sécrétaient davantage de triglycérides (Fig. 14C). Cela suggère une hausse de la sécrétion de VLDL par l'entremise de l'apoE telle que déjà mentionnée (7;8). Comment alors expliquer une hausse de la sécrétion de VLDL lorsqu'il y a une réduction de lipides cellulaires (Fig. 12 et 14)? Les acides gras sont: (1) des molécules retrouvées, entre autres, au sein des membranes plasmiques où elles peuvent influencer la fluidité et l'activité des récepteurs et des protéines de transport, (2) des composantes de certaines classes de lipides dont les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol estérifié, nécessaires à la formation des lipoprotéines et (3) des molécules de signalisation impliquées dans la régulation génique (237). Huang et al. ont d'ailleurs montré que l'oléate augmentait la synthèse et la sécrétion de l'apoE dans les macrophages en altérant le patron de glycosylation de la protéine (238). Ils ont transfecté de façon stable l'apoE3 dans les cellules J774 et ont utilisé des

concentrations d'oléate similaires à celles utilisées lors de nos expériences. On peut émettre l'hypothèse que l'oléate favorise la sécrétion de l'apoE dans les cellules HepG2. Même en dépit d'un niveau réduit en oléate libre (Fig. 12C), une plus grande quantité d'apoE provenant des cellules E+ pourrait être sécrétée et faciliter la sortie de triglycérides. Par ailleurs, les travaux de Nordby et al. ont montré que l'oléate permettait la sécrétion de triglycérides dans des hépatocytes isolés de rat (239). Par conséquent, la baisse du niveau de lipides cellulaires (Fig. 12 et 14) pourrait être reliée à une sécrétion accrue des VLDL par le biais de l'apoE dans les cellules E+ (Fig. 14B)

Dans un autre ordre d'idée, l'apoE des cellules E+ pourrait empêcher la captation des VLDL par le foie (240). Au sein de notre laboratoire, il a été montré qu'une surexpression stable de l'apoC-I dans les cellules HepG2 engendrait une hausse de la sécrétion de l'apoC-III et de l'apoE (données non publiées). Il faudrait alors vérifier si le fait de surexprimer l'apoE dans les cellules HepG2 mène au même résultat. Il a été mentionné que l'apoC-III contribuait au développement de l'hypertriglycéridémie en diminuant la capture des lipoprotéines riches en triglycérides et en déplaçant l'apoE des VLDL (240). Dans l'éventualité où la surexpression de l'apoE faciliterait la hausse d'expression de l'apoC-III, la capture des VLDL par le foie pourrait être altérée par la présence de l'apoC-III et expliquer la baisse des lipides cellulaires. Par ailleurs, l'apoE a aussi un effet inhibiteur sur la lipolyse des particules VLDL-TG. L'apoE inhiberait de manière dose-dépendante l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL). L'excès d'apoE sur les VLDL-TG déplacerait l'apoC-II, un co-facteur essentiel à la LPL, résultant en l'accumulation de VLDL dans le plasma (240-243).

Dans le futur, il serait intéressant de répéter les expériences avec d'autres lignées cellulaires HepG2 surexprimant l'apoE. De cette façon, nous pourrions confirmer nos résultats et éliminer les questions d'effets de positionnement du vecteur. L'insertion des vecteurs d'expression se fait de

façon aléatoire dans le génome de la cellule et pourrait par conséquent altérer l'expression de protéines importantes dans l'incorporation d'acides gras et le métabolisme des lipides au niveau du surexprimant apoE. Des expériences pourraient être effectuées avec différentes concentrations d'acides gras, de glycérol ou de cholestérol radioactifs afin de mieux caractériser l'effet de l'apoE sur le métabolisme des acides gras, des triglycérides et du cholestérol. De plus, les expériences ont été effectuées en absence de sérum. L'ajout de sérum contenant différentes classes de lipoprotéines, d'hormones ou de facteurs de croissance permettrait de vérifier (en conditions plus physiologiques) l'impact d'une surexpression de l'apoE sur le métabolisme des hépatocytes. Finalement, le rôle de l'oléate sur la glycosylation de l'apoE et les effets sur le métabolisme lipidique des cellules HepG2 doit être clarifiés.

Les diverses données recueillies au cours de ce projet de recherche suggèrent un rôle de l'apoE dans la sécrétion des VLDL. En effet, l'apoE favorise la sécrétion plutôt que la synthèse des triglycérides dans les cellules surexprimant l'apoE. Elle permet également d'inhiber l'incorporation d'acides gras et la synthèse subséquente de triglycérides, de phospholipides et de cholestérol cellulaires dans les cellules HepG2.

## VI- Discussion et conclusions

L'apolipoprotéine E est une molécule pléiotrope qui est exprimée dans la majorité des tissus et à laquelle plusieurs fonctions ont été attribuées. Elle est directement impliquée dans la clairance des lipoprotéines, la production de VLDL hépatiques, le transport inverse du cholestérol, l'inhibition plaquettaire, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et des cellules du muscle lisse, l'extension des neurones, l'activation d'enzymes du métabolisme des lipoprotéines et l'oxydation des lipides (chap. II, section 2.6). Peu d'études ont été consacrées au rôle de l'apoE dans le tissu adipeux. Le travail présenté dans ce mémoire montre pour la première fois que l'apoE favorise la prolifération des adipocytes et interfère avec le processus de différenciation et de maturation.

L'apoE est synthétisée et sécrétée par le tissu adipeux, mais son rôle dans ce tissu demeure inconnu. Les cellules de liposarcome SW872, un modèle d'adipocytes, ont été transfectées de façon stable avec l'apoE3 afin d'investiguer le rôle de l'apoE dans le tissu adipeux. Des études ont démontré que les niveaux d'ARNm et de protéine apoE augmentaient lors de la différenciation des adipocytes humains (13;14), suggérant une implication possible de l'apoE dans le processus de différenciation cellulaire. Dans cette optique, notre hypothèse était que l'apoE synthétisée par les cellules SW872 pourrait permettre l'accumulation de lipides en favorisant la capture des lipoprotéines par les adipocytes.

La transfection de l'apoE dans les cellules SW872 a permis la caractérisation de 11 clones surexprimant l'apoE à divers degrés. Les cellules E+, E++ et E+++ exprimant respectivement 3, 8 et 25 fois plus d'apoE cellulaire que les cellules témoins ont été cultivées en présence ou en absence de lipoprotéines afin d'évaluer le métabolisme lipidique des adipocytes. À notre grande surprise, les quantités de triglycérides et de

cholestérol cellulaires étaient réduites dans les cellules surexprimant l'apoE (chap. III; Fig. 5-6). Ces cellules avaient également la particularité de croître rapidement. En fait, nous avons démontré que la division cellulaire était accélérée et l'arrêt de croissance était retardé dans les cellules surexprimant l'apoE (chap. III; Fig. 8, chap. IV; Fig. 10). La littérature scientifique fait état de la nécessité d'un arrêt de croissance précédant le processus de différenciation et il est généralement accepté que la prolifération et la différenciation cellulaires sont mutuellement exclusives [132]. PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2 et C/EBP- $\alpha$  sont des régulateurs importants de la différenciation cellulaire des adipocytes. Nous avons donc vérifié si l'expression de ces gènes était perturbée dans les cellules surexprimant l'apoE. Après 15 jours de maturation, les transfectants apoE avaient significativement moins de PPAR- $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2, alors que l'expression de C/EBP- $\alpha$  était similaire aux cellules témoins (chap. III; Fig. 9 et Tableau I). Ces résultats sont en accord avec les travaux démontrant qu'une déficience en PPAR- $\gamma$  engendre une réduction de l'accumulation de lipides dans les adipocytes, empêchant le développement de l'obésité [244]. L'analyse par PCR en temps réel du niveau d'ARNm de certains gènes cibles du métabolisme des lipides a permis de mettre en évidence une baisse de l'expression du VLDLR, LDLR et de SCD1 (chap. III; Tableau I, chap. IV; Tableau II). La diminution de l'accumulation de lipides pourrait s'expliquer par une stimulation de la lipolyse ou par l'inhibition de la lipogénèse dans les surexprimants apoE, qui est d'ailleurs appuyée par la réduction de l'expression de SCD1 dans ces cellules. L'expression à la baisse du VLDLR et du LDLR pourrait également contribuer à la réduction de lipides cellulaires et être aussi causée par le stade précoce de maturité des transfectants apoE. Finalement, la disponibilité en acides gras extracellulaires pourrait être diminuée et expliquer en partie l'accumulation réduite de lipides dans les surexprimants apoE.

L'ensemble de ces données apporte de nouvelles évidences quant au rôle de l'apoE dans le tissu adipeux. Cependant, plusieurs questions

demeurent sans réponse. Plusieurs expériences sont requises afin de mieux caractériser les effets de l'apoE lors du développement des adipocytes. Une hausse de la croissance cellulaire pour les transfectants apoE a été décelée lorsque ceux-ci étaient incubés en présence de sérum normal, de sérum supplémenté en acides gras et de sérum dépourvu de lipoprotéines (chap. III; Fig. 5 & 6, chap. IV; Fig. 11). Le point commun entre ces trois conditions de culture cellulaire est la présence de sérum. Le sérum contient plusieurs éléments qui affectent la croissance cellulaire. Plusieurs de ces facteurs de croissance, tels que EGF, TGF- $\alpha$  et  $\beta$ , et TNF- $\alpha$ , inhibent la différenciation cellulaire des adipocytes (Chap. II, section 3.3.1). Il serait donc intéressant d'utiliser des anticorps spécifiques contre leurs récepteurs respectifs afin de vérifier leur implication sur la différenciation des cellules surexprimant l'apoE. Ces expériences permettraient aussi de caractériser les voies de signalisation activées par ces récepteurs.

Le gène *APOE* permet la synthèse de trois isoformes: apoE2, apoE3 et apoE4. Chacun de ces polymorphismes affecte à sa façon le métabolisme des lipoprotéines (chap. II, section 2.4). Ces différences s'étendent également au sein des cellules. Par exemple, l'apoE3 et l'apoE4 n'ont pas le même effet sur l'assemblage des microtubules dans les neurones et sur l'extension des neurones (chap. II, section 2.6.6). Par conséquent, les cellules SW872 pourraient être transfectées avec l'apoE2 et l'apoE4 afin de vérifier l'impact du polymorphisme de l'apoE sur la différenciation cellulaire des adipocytes.

Les cellules SW872 ont été transfectées avec le vecteur pCDNA3-apoE. Ce type de vecteur contient un promoteur cytomégalovirus (CMV) qui permet l'expression constante et souvent à haut niveau de la protéine d'intérêt. Nos résultats indiquent que l'effet de l'apoE sur la différenciation cellulaire se situe entre les jours 2 et 15. Cependant, il est impossible de dire avec précision à quel moment l'apoE intervient dans ce processus. Afin de

répondre à cette question, les cellules SW872 pourraient être transfectées avec un vecteur d'expression contenant un promoteur inducible. Ce type de vecteur nécessite la présence d'une molécule spécifique (ion métallique, métabolite ou une hormone) pour permettre son activation. En absence de son stimulus, le promoteur est inactif et la protéine n'est pas exprimée.

L'utilisation de petits ARN interférences (siRNA) est une approche efficace dans l'optique d'identifier l'effet d'une réduction de l'expression d'un gène cible dans un tissu (244). Les cellules SW872 pourraient être transfectées de façon stable (promoteur constitutif et/ou inducible) avec des duplex de siRNA afin de vérifier l'impact d'une réduction d'apoE sur la différenciation et la maturation cellulaire des adipocytes. Malheureusement, il est difficile d'inhiber complètement la synthèse de l'apoE par cette technique. Par conséquent, il serait préférable d'effectuer une délétion spécifique de l'apoE dans le tissu adipeux de souris à l'aide d'un système de knockout conditionnel de type Cre/lox (245).

Le knockout conditionnel offrirait l'avantage de vérifier l'impact d'une délétion de l'apoE dans le tissu adipeux, mais également sur les autres tissus de l'organisme. Dans ce système, un site lox flanquant de part et d'autre le gène de l'apoE serait inséré dans les cellules souches de souris afin de générer une lignée de souris transgénique. D'autre part, une lignée qui exprimerait la recombinaison Cre sous le promoteur d'un gène spécifique du tissu adipeux (ex: aP2) serait utilisée. Finalement, il y aurait un croisement entre les deux types de souris, puis la recombinaison Cre exciserait le gène *APOE* situé entre les sites lox afin de générer des souris déficientes en apoE spécifiquement dans le tissu adipeux (aP2-Cre/*APOE*<sup>lox/lox</sup>)

À la lumière des résultats obtenus avec les surexprimants apoE, pouvons-nous affirmer qu'une surexpression de l'apoE dans le tissu adipeux serait bénéfique? À première vue, il est difficile d'extrapoler à partir des

résultats obtenus sur un type cellulaire qui n'est pas dans son contexte optimal. La réponse à cette question viendrait de l'étude *in vivo* d'une surexpression ou d'une délétion spécifique de l'apoE dans le tissu adipeux chez la souris. À première vue, il paraît difficile de prévoir l'effet de l'apoE sur l'obésité. Bien que les transfectants apoE accumulent moins de lipides (adipocytes moins volumineux), la croissance cellulaire y est augmentée (augmentation de la quantité d'adipocytes). Néanmoins, il est permis de croire que la baisse de l'expression de PPAR- $\gamma$  chez les transfectants apoE puisse affecter les fonctions physiologiques de ces adipocytes et de l'organisme.

Il a été démontré que les humains ayant des mutations dominantes négatives de PPAR- $\gamma$  développent le syndrome métabolique (résistance sévère à l'insuline, dyslipidémies et hypertension) (172). De plus, l'inactivation de PPAR- $\gamma$  dans le tissu adipeux de souris mène au même résultat, ce qui démontre un rôle très important de PPAR- $\gamma$  provenant des adipocytes dans l'homéostasie globale de l'organisme. Cette étude a montré que les souris hétérozygotes pour PPAR- $\gamma$  ont une concentration élevée en acides gras plasmatiques et développaient de la stéatose hépatique, la résistance à l'insuline et l'hypertension (245). Cependant, Jones et al., en supprimant le gène PPAR- $\gamma$  du tissu adipeux de souris, n'ont pas constaté de résistance à l'insuline (218). Ils ont remarqué une réduction de poids malgré une hyperphagie chez les souris déficientes en PPAR- $\gamma$  dans le tissu adipeux. Néanmoins, il est donc permis de suggérer qu'une surexpression de l'apoE dans le tissu adipeux de souris ou d'humain puisse affecter différentes fonctions de l'organisme et entraîner le développement de pathologies par le biais d'une déficience en PPAR- $\gamma$ . Nos travaux indiquent que les cellules surexprimant l'apoE sont moins matures (moins de lipides, niveau réduit de PPAR- $\gamma$ ). Sachant que les adipokines sont sécrétées par les adipocytes matures (chap. II, section 3.5), l'expression de celles-ci pourrait être différemment régulée lors d'une surexpression de l'apoE dans le tissu

adipeux. Par ailleurs, la délétion de PPAR- $\gamma$  dans le tissu adipeux de souris diminue le niveau de leptine et d'adiponectine plasmatiques (218).

Mon deuxième projet de recherche visait à identifier de quelle façon l'apoE engendrait la synthèse et la sécrétion de VLDL dans le foie. Les cellules HepG2, un bon modèle d'hépatocytes, ont été transfectées de façon stable avec l'apoE3 et exposées à l'acide gras oléate. Nous pensions que l'apoE pourrait faciliter l'entrée d'acides gras dans le foie et favoriser la synthèse des lipides nécessaires à la production de VLDL hépatiques. Contrairement à notre hypothèse, les cellules surexprimant l'apoE avaient une incorporation réduite en acides gras, jumelée à une diminution de l'oléate libre, des triglycérides, du cholestérol et des phospholipides cellulaires (chap. V; Fig.12-14). Finalement, une augmentation de la sécrétion de triglycérides a été décelée chez les surexprimants apoE (chap. V; Fig. 14).

Il est bien connu que l'apoE permet l'épuration des lipoprotéines par le foie en agissant comme ligand pour différents récepteurs membranaires (18-20). Par contre, aucune étude scientifique n'a démontré un effet de l'apoE sur l'incorporation d'acides gras. Une fois synthétisée et sécrétée par les cellules HepG2, une fraction de l'apoE se lie aux *chondroitin sulfate proteoglycan* (CSPG) ou aux heparan sulfate proteoglycan (HSPG) (246). Nous pouvons suggérer qu'une plus grande concentration d'apoE se retrouve ancrée aux CSPG et aux HSPG pour les cellules E+, ce qui pourrait nuire aux transporteurs d'acides gras et expliquer la diminution d'entrée d'acides gras dans les cellules HepG2. Afin de comprendre l'effet de ce pool d'apoE sur la cinétique d'incorporation d'acides gras vers le foie, les cellules E+ pourraient être traitées avec l'héparine, la suramine ou la chondroïtine sulfate A et B qui sont reconnues pour réduire la quantité d'apoE à la surface cellulaire (246). Les différents effets observés lors de la surexpression de l'apoE et le traitement avec l'oléate dans les cellules HepG2 (Fig. 15) pourraient également être analysés lors d'une déficience de l'apoE induite par

l'utilisation de siRNA dans les cellules HepG2. Finalement, il serait intéressant de vérifier l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme des lipides des cellules HepG2. L'accent pourrait être mis sur les transporteur d'acides gras (CD36, FATP, FABPpm,...) qui pourraient bien être régulés à la baisse et occasionner la réduction subséquente des lipides cellulaires.

Il est évident qu'il est prématuré d'affirmer que l'apoE a un rôle dans l'inhibition de l'incorporation d'acides gras et la synthèse de lipides cellulaires dans les cellules HepG2. La création de nouveaux surexprimants de l'apoE est un prérequis afin de répondre à toutes les interrogations liées aux résultats observés pendant ce projet de recherche. Néanmoins, dans l'éventualité où l'apoE aurait véritablement un effet inhibiteur sur l'incorporation d'acides gras, elle pourrait contribuer à l'accumulation d'acides gras plasmatiques. De cette façon, un niveau élevé en acides gras pourrait favoriser entre autre la résistance à l'insuline et le diabète non-insulino dépendant (247).

En conclusion, nous avons démontré qu'une hausse de l'apoE cellulaire augmente la croissance cellulaire et diminue l'accumulation de lipides dans les adipocytes humains SW872. Ces effets sont associés à une réduction de l'expression des marqueurs de différenciation: PPAR- $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2, proposant une différenciation et une maturation déficiente de ces cellules. Par ailleurs, la réduction de l'expression de SCD1 invoque la possibilité d'un problème au niveau de la lipogénèse pour les transfectants apoE et le faible niveau d'expression du VLDLR et du LDLR pourrait également contribuer à la diminution de l'accumulation de lipides lors de la maturation de ces cellules en présence de lipoprotéines. Des études *in vivo* à partir de souris sont essentielles afin de caractériser globalement l'effet de l'apoE sur l'ensemble des systèmes de l'organisme.

Nous avons également démontré qu'une surexpression de l'apoE entraîne l'inhibition de l'incorporation d'acides gras et la synthèse des triglycérides, du cholestérol et des phospholipides cellulaires dans les cellules HepG2. De plus, une hausse de la sécrétion de triglycérides par le transfectant apoE suggère un effet stimulant de l'apoE sur la sécrétion de VLDL. Il reste à clarifier le rôle de l'oléate dans tous ces processus. De plus, l'élaboration de nouveaux transfectants apoE permettrait de confirmer les présents résultats et d'élucider le rôle de cette protéine dans l'incorporation d'acides gras et le métabolisme lipidique des hépatocytes.

## VII-Références

1. Kuczmarski,RJ, Flegal,KM, Campbell,SM, Johnson,CL: Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA* 272:205-211, 1994
2. Wolf,AM, Colditz,GA: Social and economic effects of body weight in the United States. *Am.J.Clin.Nutr.* 63:466S-469S, 1996
3. Calle,EE, Rodriguez,C, Walker-Thurmond,K, Thun,MJ: Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N.Engl.J.Med.* 348:1625-1638, 2003
4. Must,A, Spadano,J, Coakley,EH, Field,AE, Colditz,G, Dietz,WH: The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 282:1523-1529, 1999
5. Esposito,K, Giugliano,D: Effect of rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk. *Lancet* 366:367-368, 2005
6. Gimeno,RE, Klaman,LD: Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Curr.Opin.Pharmacol.* 5:122-128, 2005
7. Maugeais,C, Tietge,UJ, Tsukamoto,K, Glick,JM, Rader,DJ: Hepatic apolipoprotein E expression promotes very low density lipoprotein-apolipoprotein B production in vivo in mice. *J.Lipid Res.* 41:1673-1679, 2000
8. Mensenkamp,AR, Jong,MC, van Goor,H, van Luyn,MJ, Bloks,V, Havinga,R, Voshol,PJ, Hofker,MH, van Dijk,KW, Havekes,LM, Kuipers,F: Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. *J.Biol.Chem.* 274:35711-35718, 1999

9. Driscoll,DM, Getz,GS: Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. *J.Lipid Res.* 25:1368-1379, 1984
10. Elshourbagy,NA, Liao,WS, Mahley,RW, Taylor,JM: Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82:203-207, 1985
11. Kraft,HG, Menzel,HJ, Hoppichler,F, Vogel,W, Utermann,G: Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis. *J.Clin.Invest* 83:137-142, 1989
12. Newman,TC, Dawson,PA, Rudel,LL, Williams,DL: Quantitation of apolipoprotein E mRNA in the liver and peripheral tissues of nonhuman primates. *J.Biol.Chem.* 260:2452-2457, 1985
13. Zechner,R, Moser,R, Newman,TC, Fried,SK, Breslow,JL: Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. *J.Biol.Chem.* 266:10583-10588, 1991
14. Wassef,H, Bernier,L, Davignon,J, Cohn,JS: Synthesis and secretion of apoC-I and apoE during maturation of human SW872 liposarcoma cells. *J.Nutr.* 134:2935-2941, 2004
15. Chiba,T, Nakazawa,T, Yui,K, Kaneko,E, Shimokado,K: VLDL induces adipocyte differentiation in ApoE-dependent manner. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23:1423-1429, 2003
16. Schreyer,SA, Lystig,TC, Vick,CM, LeBoeuf,RC: Mice deficient in apolipoprotein E but not LDL receptors are resistant to accelerated atherosclerosis associated with obesity. *Atherosclerosis* 171:49-55, 2003

17. Pauciuolo,P: Lipoprotein transport and metabolism: a brief update. *Nutr.Metab Cardiovasc.Dis.* 12:90-97, 2002
18. Mahley,RW, Ji,ZS: Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J.Lipid Res.* 40:1-16, 1999
19. Mahley,RW, Rall,SC, Jr.: Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 1:507-537, 2000
20. Weisgraber,KH: Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv.Protein Chem.* 45:249-302, 1994
21. Schaefer,EJ: Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am.J.Clin.Nutr.* 75:191-212, 2002
22. Griffin,BA, Fielding,BA: Postprandial lipid handling. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* 4:93-98, 2001
23. Goldberg,IJ, Merkel,M: Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci.* 6:D388-D405, 2001
24. Redgrave,TG: Chylomicron metabolism. *Biochem.Soc.Trans.* 32:79-82, 2004
25. Shachter,NS: Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr.Opin.Lipidol.* 12:297-304, 2001
26. Cohn,JS, Johnson,EJ, Millar,JS, Cohn,SD, Milne,RW, Marcel,YL, Russell,RM, Schaefer,EJ: Contribution of apoB-48 and apoB-100 triglyceride-rich lipoproteins (TRL) to postprandial increases in the plasma concentration of TRL triglycerides and retinyl esters. *J.Lipid Res.* 34:2033-2040, 1993

27. Santamarina-Fojo,S, Haudenschild,C, Amar,M: The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 9:211-219, 1998
28. Zambon,A, Deeb,SS, Bensadoun,A, Foster,KE, Brunzell,JD: In vivo evidence of a role for hepatic lipase in human apoB-containing lipoprotein metabolism, independent of its lipolytic activity. *J.Lipid Res.* 41:2094-2099, 2000
29. Campos,H, Perlov,D, Khoo,C, Sacks,FM: Distinct patterns of lipoproteins with apoB defined by presence of apoE or apoC-III in hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *J.Lipid Res.* 42:1239-1249, 2001
30. Yamashita,S, Sakai,N, Hirano,K, Ishigami,M, Maruyama,T, Nakajima,N, Matsuzawa,Y: Roles of plasma lipid transfer proteins in reverse cholesterol transport. *Front Biosci.* 6:D366-D387, 2001
31. Millar,JS, Packard,CJ: Heterogeneity of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins: what we have learnt from kinetic studies. *Curr.Opin.Lipidol.* 9:197-202, 1998
32. Wang,M, Briggs,MR: HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chem.Rev.* 104:119-137, 2004
33. Schaefer,EJ, Heaton,WH, Wetzel,MG, Brewer,HB, Jr.: Plasma apolipoprotein A-1 absence associated with a marked reduction of high density lipoproteins and premature coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 2:16-26, 1982
34. Phillips,MC, Gillotte,KL, Haynes,MP, Johnson,WJ, Lund-Katz,S, Rothblat,GH: Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes. *Atherosclerosis* 137 Suppl:S13-S17, 1998

35. Rader,DJ: Regulation of reverse cholesterol transport and clinical implications. *Am.J.Cardiol.* 92:42J-49J, 2003
36. Allan,CM, Walker,D, Taylor,JM: Evolutionary duplication of a hepatic control region in the human apolipoprotein E gene locus. Identification of a second region that confers high level and liver-specific expression of the human apolipoprotein E gene in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 270:26278-26281, 1995
37. Allan,CM, Walker,D, Segrest,JP, Taylor,JM: Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, C-I, and C-II gene locus. *Genomics* 28:291-300, 1995
38. 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.* 275:31567-31572, 2000
39. Rall,SC, Jr., Weisgraber,KH, Mahley,RW: Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J.Biol.Chem.* 257:4171-4178, 1982
40. Shore,VG, Shore,B: Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 12:502-507, 1973
41. Chou,PY, Fasman,GD: Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13:222-245, 1974
42. Mazzone,T, Papagiannes,E, Magner,J: Early kinetics of human macrophage apolipoprotein E synthesis and incorporation of carbohydrate precursors. *Biochim.Biophys.Acta* 875:393-396, 1986
43. Dahan,S, Ahluwalia,JP, Wong,L, Posner,BI, Bergeron,JJ: Concentration of intracellular hepatic apolipoprotein E in Golgi

- apparatus saccular distensions and endosomes. *J.Cell Biol.* 127:1859-1869, 1994
44. Fazio,S, Linton,MF, Swift,LL: The cell biology and physiologic relevance of ApoE recycling. *Trends Cardiovasc.Med.* 10:23-30, 2000
  45. Ho,YY, Al Haideri,M, Mazzone,T, Vogel,T, Presley,JF, Sturley,SL, Deckelbaum,RJ: Endogenously expressed apolipoprotein E has different effects on cell lipid metabolism as compared to exogenous apolipoprotein E carried on triglyceride-rich particles. *Biochemistry* 39:4746-4754, 2000
  46. Mahley,RW: Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622-630, 1988
  47. Duan,H, Lin,CY, Mazzone,T: Degradation of macrophage ApoE in a nonlysosomal compartment. Regulation by sterols. *J.Biol.Chem.* 272:31156-31162, 1997
  48. Mazzone,T, Pustelnikas,L, Reardon,CA: Post-translational regulation of macrophage apoprotein E production. *J.Biol.Chem.* 267:1081-1087, 1992
  49. Quinn,CM, Kagedal,K, Terman,A, Stroikin,U, Brunk,UT, Jessup,W, Garner,B: Induction of fibroblast apolipoprotein E expression during apoptosis, starvation-induced growth arrest and mitosis. *Biochem.J.* 378:753-761, 2004
  50. Heeren,J, Weber,W, Beisiegel,U: Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J.Cell Sci.* 112 ( Pt 3):349-359, 1999
  51. Heeren,J, Grewal,T, Jackle,S, Beisiegel,U: Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J.Biol.Chem.* 276:42333-42338, 2001

52. Heeren,J, Grewal,T, Laatsch,A, Rottke,D, Rinninger,F, Enrich,C, Beisiegel,U: Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J.Biol.Chem.* 278:14370-14378, 2003
53. Lucas,M, Mazzone,T: Cell surface proteoglycans modulate net synthesis and secretion of macrophage apolipoprotein E. *J.Biol.Chem.* 271:13454-13460, 1996
54. Zhao,Y, Mazzone,T: Transport and processing of endogenously synthesized ApoE on the macrophage cell surface. *J.Biol.Chem.* 275:4759-4765, 2000
55. Huang,Y, Weisgraber,KH, Mucke,L, Mahley,RW: Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J.Mol.Neurosci.* 23:189-204, 2004
56. De Loof,H, Rosseneu,M, Brasseur,R, Ruyschaert,JM: Use of hydrophobicity profiles to predict receptor binding domains on apolipoprotein E and the low density lipoprotein apolipoprotein B-E receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:2295-2299, 1986
57. Weisgraber,KH, Rall,SC, Jr., Mahley,RW, Milne,RW, Marcel,YL, Sparrow,JT: Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J.Biol.Chem.* 261:2068-2076, 1986
58. Dergunov,AD, Vorotnikova,YY, Visvikis,S, Siest,G: Homo- and hetero-complexes of exchangeable apolipoproteins in solution and in lipid-bound form. *Spectrochim.Acta A Mol.Biomol.Spectrosc.* 59:1127-1137, 2003
59. 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.* 272:29113-29119, 1997

60. 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.* 268:8221-8229, 1993
61. Brand,K, Mackman,N, Curtiss,LK: Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms. *J.Clin.Invest* 91:2031-2039, 1993
62. Berg,DT, Calnek,DS, Grinnell,BW: Trans-repressor BEF-1 phosphorylation. A potential control mechanism for human ApoE gene regulation. *J.Biol.Chem.* 271:4589-4592, 1996
63. Zuckerman,SH, O'Neal,L: Endotoxin and GM-CSF-mediated down-regulation of macrophage apo E secretion is inhibited by a TNF-specific monoclonal antibody. *J.Leukoc.Biol.* 55:743-748, 1994
64. Duan,H, Li,Z, Mazzone,T: Tumor necrosis factor-alpha modulates monocyte/macrophage apoprotein E gene expression. *J.Clin.Invest* 96:915-922, 1995
65. Zuckerman,SH, Evans,GF, O'Neal,L: Cytokine regulation of macrophage apo E secretion: opposing effects of GM-CSF and TGF-beta. *Atherosclerosis* 96:203-214, 1992
66. Larkin,L, Khachigian,LM, Jessup,W: Regulation of apolipoprotein E production in macrophages (review). *Int.J.Mol.Med.* 6:253-258, 2000
67. 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:507-512, 2001

68. 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.* 357:521-527, 2001
69. Lambert,JC, Brousseau,T, Defosse,V, Evans,A, Arveiler,D, Ruidavets,JB, Haas,B, Cambou,JP, Luc,G, Ducimetiere,P, Cambien,F, Chartier-Harlin,MC, Amouyel,P: Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations-the ECTIM study. *Hum.Mol.Genet.* 9:57-61, 2000
70. Viitanen,L, Pihlajamaki,J, Miettinen,R, Karkkainen,P, Vauhkonen,I, Halonen,P, Kareinen,A, Lehto,S, Laakso,M: Apolipoprotein E gene promoter (-219G/T) polymorphism is associated with premature coronary heart disease. *J.Mol.Med.* 79:732-737, 2001
71. Zannis,VI, Breslow,JL, Utermann,G, Mahley,RW, Weisgraber,KH, Havel,RJ, Goldstein,JL, Brown,MS, Schonfeld,G, Hazzard,WR, Blum,C: Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J.Lipid Res.* 23:911-914, 1982
72. Eichner,JE, Dunn,ST, Perveen,G, Thompson,DM, Stewart,KE, Stroehla,BC: Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am.J.Epidemiol.* 155:487-495, 2002
73. Zannis,VI, Breslow,JL: Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry* 20:1033-1041, 1981
74. Davignon,J, Gregg,RE, Sing,CF: Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8:1-21, 1988

75. Siest,G, Pillot,T, Regis-Bailly,A, Leininger-Muller,B, Steinmetz,J, Galteau,MM, Visvikis,S: Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin.Chem.* 41:1068-1086, 1995
76. Demant,T, Bedford,D, Packard,CJ, Shepherd,J: Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipemic subjects. *J.Clin.Invest* 88:1490-1501, 1991
77. Weintraub,MS, Eisenberg,S, Breslow,JL: Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J.Clin.Invest* 80:1571-1577, 1987
78. Utermann,G: Apolipoprotein E (role in lipoprotein metabolism and pathophysiology of hyperlipoproteinemia type III). *Ric.Clin.Lab* 12:23-30, 1982
79. Havel,RJ: Familial dysbetalipoproteinemia. New aspects of pathogenesis and diagnosis. *Med.Clin.North Am.* 66:441-454, 1982
80. Mahley,RW, Huang,Y, Rall,SC, Jr.: Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J.Lipid Res.* 40:1933-1949, 1999
81. Corder,EH, Saunders,AM, Strittmatter,WJ, Schmechel,DE, Gaskell,PC, Small,GW, Roses,AD, Haines,JL, Pericak-Vance,MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923, 1993
82. Hardy,J, Selkoe,DJ: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356, 2002
83. Selkoe,DJ: Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 32:177-180, 2001

84. Juvonen,T, Kervinen,K, Kairaluoma,MI, Lajunen,LH, Kesaniemi,YA: Gallstone cholesterol content is related to apolipoprotein E polymorphism. *Gastroenterology* 104:1806-1813, 1993
85. Kervinen,K, Sodervik,H, Makela,J, Lehtola,J, Niemi,M, Kairaluoma,MI, Kesaniemi,YA: Is the development of adenoma and carcinoma in proximal colon related to apolipoprotein E phenotype? *Gastroenterology* 110:1785-1790, 1996
86. Song,Y, Stampfer,MJ, Liu,S: Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann.Intern.Med.* 141:137-147, 2004
87. Kolovou,G, Daskalova,D, Mikhailidis,DP: Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Angiology* 54:59-71, 2003
88. Lahiri,DK, Sambamurti,K, Bennett,DA: Apolipoprotein gene and its interaction with the environmentally driven risk factors: molecular, genetic and epidemiological studies of Alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging* 25:651-660, 2004
89. Raber,J, Huang,Y, Ashford,JW: ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol.Aging* 25:641-650, 2004
90. Davignon,J, Cohn,JS, Mabile,L, Bernier,L: Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin.Chim.Acta* 286:115-143, 1999
91. Plump,AS, Smith,JD, Hayek,T, Aalto-Setala,K, Walsh,A, Verstuyft,JG, Rubin,EM, Breslow,JL: Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-353, 1992

92. Ghiselli,G, Schaefer,EJ, Gascon,P, Breser,HB, Jr.: Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science* 214:1239-1241, 1981
93. Kuipers,F, van Ree,JM, Hofker,MH, Wolters,H, In't,VG, Havinga,R, Vonk,RJ, Princen,HM, Havekes,LM: Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver. *Hepatology* 24:241-247, 1996
94. Kuipers,F, Jong,MC, Lin,Y, Eck,M, Havinga,R, Bloks,V, Verkade,HJ, Hofker,MH, Moshage,H, Berkel,TJ, Vonk,RJ, Havekes,LM: Impaired secretion of very low density lipoprotein-triglycerides by apolipoprotein E- deficient mouse hepatocytes. *J.Clin.Invest* 100:2915-2922, 1997
95. Basu,SK, Goldstein,JL, Brown,MS: Independent pathways for secretion of cholesterol and apolipoprotein E by macrophages. *Science* 219:871-873, 1983
96. Dory,L: Synthesis and secretion of apoE in thioglycolate-elicited mouse peritoneal macrophages: effect of cholesterol efflux. *J.Lipid Res.* 30:809-816, 1989
97. Lin,CY, Huang,ZH, Mazzone,T: Interaction with proteoglycans enhances the sterol efflux produced by endogenous expression of macrophage apoE. *J.Lipid Res.* 42:1125-1133, 2001
98. Krieger,M: Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu.Rev.Biochem.* 68:523-558, 1999
99. Krimbou,L, Denis,M, Haidar,B, Carrier,M, Marcil,M, Genest,J, Jr.: Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation. *J.Lipid Res.* 45:839-848, 2004

100. Mazzone,T, Reardon,C: Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux to HDL3. *J.Lipid Res.* 35:1345-1353, 1994
101. Granot,E, Eisenberg,S: Failure of exogenous apoprotein E-3 to enhance cholesterol egress from J-774 murine macrophages in culture. *Atherosclerosis* 114:115-122, 1995
102. Fazio,S, Babaev,VR, Murray,AB, Hasty,AH, Carter,KJ, Gleaves,LA, Atkinson,JB, Linton,MF: Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:4647-4652, 1997
103. Gough,PJ, Raines,EW: Gene therapy of apolipoprotein E-deficient mice using a novel macrophage-specific retroviral vector. *Blood* 101:485-491, 2003
104. Hasty,AH, Linton,MF, Brandt,SJ, Babaev,VR, Gleaves,LA, Fazio,S: Retroviral gene therapy in ApoE-deficient mice: ApoE expression in the artery wall reduces early foam cell lesion formation. *Circulation* 99:2571-2576, 1999
105. Shimano,H, Ohsuga,J, Shimada,M, Namba,Y, Gotoda,T, Harada,K, Katsuki,M, Yazaki,Y, Yamada,N: Inhibition of diet-induced atheroma formation in transgenic mice expressing apolipoprotein E in the arterial wall. *J.Clin.Invest* 95:469-476, 1995
106. Van Eck,M, Herijgers,N, Vidgeon-Hart,M, Pearce,NJ, Hoogerbrugge,PM, Groot,PH, Van Berkel,TJ: Accelerated atherosclerosis in C57Bl/6 mice transplanted with ApoE-deficient bone marrow. *Atherosclerosis* 150:71-80, 2000
107. Davignon,J: Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25:267-269, 2005

108. Riddell,DR, Graham,A, Owen,JS: Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *J.Biol.Chem.* 272:89-95, 1997
109. Desai,K, Bruckdorfer,KR, Hutton,RA, Owen,JS: Binding of apoE-rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. *J.Lipid Res.* 30:831-840, 1989
110. Pedreno,J, Hurt-Camejo,E, Wiklund,O, Badimon,L, Masana,L: Platelet function in patients with familial hypertriglyceridemia: evidence that platelet reactivity is modulated by apolipoprotein E content of very-low-density lipoprotein particles. *Metabolism* 49:942-949, 2000
111. Riddell,DR, Vinogradov,DV, Stannard,AK, Chadwick,N, Owen,JS: Identification and characterization of LRP8 (apoER2) in human blood platelets. *J.Lipid Res.* 40:1925-1930, 1999
112. Kelly,ME, Clay,MA, Mistry,MJ, Hsieh-Li,HM, Harmony,JA: Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol.* 159:124-139, 1994
113. Pepe,MG, Curtiss,LK: Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. *J.Immunol.* 136:3716-3723, 1986
114. Mistry,MJ, Clay,MA, Kelly,ME, Steiner,MA, Harmony,JA: Apolipoprotein E restricts interleukin-dependent T lymphocyte proliferation at the G1A/G1B boundary. *Cell Immunol.* 160:14-23, 1995
115. Hui,DY, Harmony,JA, Innerarity,TL, Mahley,RW: Immunoregulatory plasma lipoproteins. Role of apoprotein E and apoprotein B. *J.Biol.Chem.* 255:11775-11781, 1980

116. Hui,DY, Harmony,JA: Phosphatidylinositol turnover in mitogen-activated lymphocytes. Suppression by low-density lipoproteins. *Biochem.J.* 192:91-98, 1980
117. Swertfeger,DK, Hui,DY: Apolipoprotein E: a cholesterol transport protein with lipid transport-independent cell signaling properties. *Front Biosci.* 6:D526-D535, 2001
118. Ishigami,M, Swertfeger,DK, Hui,MS, Granholm,NA, Hui,DY: Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1020-1026, 2000
119. Ishigami,M, Swertfeger,DK, Granholm,NA, Hui,DY: Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *J.Biol.Chem.* 273:20156-20161, 1998
120. Swertfeger,DK, Hui,DY: Apolipoprotein E receptor binding versus heparan sulfate proteoglycan binding in its regulation of smooth muscle cell migration and proliferation. *J.Biol.Chem.* 276:25043-25048, 2001
121. Swertfeger,DK, Bu,G, Hui,DY: Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E inhibition of smooth muscle cell migration. *J.Biol.Chem.* 277:4141-4146, 2002
122. Zhu,Y, Hui,DY: Apolipoprotein E binding to low density lipoprotein receptor-related protein-1 inhibits cell migration via activation of cAMP-dependent protein kinase A. *J.Biol.Chem.* 278:36257-36263, 2003

123. Hui,DY, Basford,JE: Distinct signaling mechanisms for apoE inhibition of cell migration and proliferation. *Neurobiol.Aging* 26:317-323, 2005
124. Nathan,BP, Bellosta,S, Sanan,DA, Weisgraber,KH, Mahley,RW, Pitas,RE: Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264:850-852, 1994
125. Fagan,AM, Bu,G, Sun,Y, Daugherty,A, Holtzman,DM: Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J.Biol.Chem.* 271:30121-30125, 1996
126. DeMattos,RB, Curtiss,LK, Williams,DL: A minimally lipidated form of cell-derived apolipoprotein E exhibits isoform-specific stimulation of neurite outgrowth in the absence of exogenous lipids or lipoproteins. *J.Biol.Chem.* 273:4206-4212, 1998
127. DeMattos,RB, Rudel,LL, Williams,DL: Biochemical analysis of cell-derived apoE3 particles active in stimulating neurite outgrowth. *J.Lipid Res.* 42:976-987, 2001
128. Holtzman,DM, Pitas,RE, Kilbridge,J, Nathan,B, Mahley,RW, Bu,G, Schwartz,AL: Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:9480-9484, 1995
129. Sun,Y, Wu,S, Bu,G, Onifade,MK, Patel,SN, LaDu,MJ, Fagan,AM, Holtzman,DM: Glial fibrillary acidic protein-apolipoprotein E (apoE) transgenic mice: astrocyte-specific expression and differing biological effects of astrocyte-secreted apoE3 and apoE4 lipoproteins. *J.Neurosci.* 18:3261-3272, 1998

130. Nathan,BP, Chang,KC, Bellosta,S, Brisch,E, Ge,N, Mahley,RW, Pitas,RE: The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization. *J.Biol.Chem.* 270:19791-19799, 1995
131. Rapoport,M, Dawson,HN, Binder,LI, Vitek,MP, Ferreira,A: Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:6364-6369, 2002
132. Tesseur,I, Van Dorpe,J, Spittaels,K, Van den,HC, Moechars,D, Van Leuven,F: Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice. *Am.J.Pathol.* 156:951-964, 2000
133. De Pauw,M, Vanloo,B, Weisgraber,K, Rosseneu,M: Comparison of lipid-binding and lecithin:cholesterol acyltransferase activation of the amino- and carboxyl-terminal domains of human apolipoprotein E3. *Biochemistry* 34:10953-10966, 1995
134. Kinoshita,M, Arai,H, Fukasawa,M, Watanabe,T, Tsukamoto,K, Hashimoto,Y, Inoue,K, Kurokawa,K, Teramoto,T: Apolipoprotein E enhances lipid exchange between lipoproteins mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J.Lipid Res.* 34:261-268, 1993
135. Thuren,T, Weisgraber,KH, Sisson,P, Waite,M: Role of apolipoprotein E in hepatic lipase catalyzed hydrolysis of phospholipid in high-density lipoproteins. *Biochemistry* 31:2332-2338, 1992
136. Miyata,M, Smith,JD: Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat.Genet.* 14:55-61, 1996

137. Chou,SC, Cheng,B, Kowal,J: Aging in rats is associated with an increase in adrenal apolipoprotein E. *Mol.Cell Endocrinol.* 107:93-97, 1995
138. Reyland,ME, Williams,DL: Suppression of cAMP-mediated signal transduction in mouse adrenocortical cells which express apolipoprotein E. *J.Biol.Chem.* 266:21099-21104, 1991
139. Reyland,ME, Prack,MM, Williams,DL: Elevated levels of protein kinase C in Y1 cells which express apolipoprotein E decrease basal steroidogenesis by inhibiting expression of P450-cholesterol side chain cleavage mRNA. *J.Biol.Chem.* 267:17933-17938, 1992
140. Faraj,M, Lu,HL, Cianflone,K: Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem.Cell Biol.* 82:170-190, 2004
141. Pairault,J, Green,H: A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76:5138-5142, 1979
142. Gregoire,FM, Smas,CM, Sul,HS: Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 78:783-809, 1998
143. Moustaid,N, Sul,HS: Regulation of expression of the fatty acid synthase gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronine. *J.Biol.Chem.* 266:18550-18554, 1991
144. Wilkison,WO, Min,HY, Claffey,KP, Satterberg,BL, Spiegelman,BM: Control of the adipsin gene in adipocyte differentiation. Identification of distinct nuclear factors binding to single- and double-stranded DNA. *J.Biol.Chem.* 265:477-482, 1990
145. Corin,RE, Guller,S, Wu,KY, Sonenberg,M: Growth hormone and adipose differentiation: growth hormone-induced antimitogenic state in

- 3T3-F442A preadipose cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:7507-7511, 1990
146. Wabitsch,M, Hauner,H, Heinze,E, Teller,WM: The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism* 44:45-49, 1995
147. Wabitsch,M, Heinze,E, Hauner,H, Shymko,RM, Teller,WM, De Meyts,P, Ilondo,MM: Biological effects of human growth hormone in rat adipocyte precursor cells and newly differentiated adipocytes in primary culture. *Metabolism* 45:34-42, 1996
148. Kamai,Y, Mikawa,S, Endo,K, Sakai,H, Komano,T: Regulation of insulin-like growth factor-I expression in mouse preadipocyte Ob1771 cells. *J.Biol.Chem.* 271:9883-9886, 1996
149. Hauner,H, Rohrig,K, Petruschke,T: Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte development and function. *Eur.J.Clin.Invest* 25:90-96, 1995
150. Serrero,G, Lepak,N: Endocrine and paracrine negative regulators of adipose differentiation. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 20 Suppl 3:S58-S64, 1996
151. Luetkeke,NC, Lee,DC, Palmiter,RD, Brinster,RL, Sandgren,EP: Regulation of fat and muscle development by transforming growth factor alpha in transgenic mice and in cultured cells. *Cell Growth Differ.* 4:203-213, 1993
152. Heino,J, Massague,J: Cell adhesion to collagen and decreased myogenic gene expression implicated in the control of myogenesis by transforming growth factor beta. *J.Biol.Chem.* 265:10181-10184, 1990

153. Petruschke,T, Rohrig,K, Hauner,H: Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits the differentiation of human adipocyte precursor cells in primary culture. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 18:532-536, 1994
154. Serrero,G, Mills,D: Decrease in transforming growth factor beta 1 binding during differentiation of rat adipocyte precursors in primary culture. *Cell Growth Differ.* 2:173-178, 1991
155. Sparks,RL, Allen,BJ, Strauss,EE: TGF-beta blocks early but not late differentiation-specific gene expression and morphologic differentiation of 3T3 T proadipocytes. *J.Cell Physiol* 150:568-577, 1992
156. Prins,JB, Niesler,CU, Winterford,CM, Bright,NA, Siddle,K, O'Rahilly,S, Walker,NI, Cameron,DP: Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 46:1939-1944, 1997
157. Barbier,O, Torra,IP, Duguay,Y, Blanquart,C, Fruchart,JC, Glineur,C, Staels,B: Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 22:717-726, 2002
158. Juge-Aubry,CE, Gorla-Bajszczak,A, Pernin,A, Lemberger,T, Wahli,W, Burger,AG, Meier,CA: Peroxisome proliferator-activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid X receptor. Possible role of a leucine zipper-like heptad repeat. *J.Biol.Chem.* 270:18117-18122, 1995
159. Tontonoz,P, Hu,E, Spiegelman,BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156, 1994
160. Kersten,S: Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *Eur.J.Pharmacol.* 440:223-234, 2002

161. Evans, RM, Barish, GD, Wang, YX: PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* 10:355-361, 2004
162. Reddy, JK, Hashimoto, T: Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu. Rev. Nutr.* 21:193-230, 2001
163. Wang, YX, Lee, CH, Tiep, S, Yu, RT, Ham, J, Kang, H, Evans, RM: Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113:159-170, 2003
164. Barak, Y, Nelson, MC, Ong, ES, Jones, YZ, Ruiz-Lozano, P, Chien, KR, Koder, A, Evans, RM: PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* 4:585-595, 1999
165. Werman, A, Hollenberg, A, Solanes, G, Bjorbaek, C, Vidal-Puig, AJ, Flier, JS: Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J. Biol. Chem.* 272:20230-20235, 1997
166. Ren, D, Collingwood, TN, Rebar, EJ, Wolffe, AP, Camp, HS: PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev.* 16:27-32, 2002
167. Saladin, R, Fajas, L, Dana, S, Halvorsen, YD, Auwerx, J, Briggs, M: Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis. *Cell Growth Differ.* 10:43-48, 1999

168. Agarwal,AK, Garg,A: A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87:408-411, 2002
169. Hegele,RA, Cao,H, Frankowski,C, Mathews,ST, Leff,T: PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes* 51:3586-3590, 2002
170. Kubota,N, Terauchi,Y, Miki,H, Tamemoto,H, Yamauchi,T, Komeda,K, Satoh,S, Nakano,R, Ishii,C, Sugiyama,T, Eto,K, Tsubamoto,Y, Okuno,A, Murakami,K, Sekihara,H, Hasegawa,G, Naito,M, Toyoshima,Y, Tanaka,S, Shiota,K, Kitamura,T, Fujita,T, Ezaki,O, Aizawa,S, Kadowaki,T, .: PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol.Cell* 4:597-609, 1999
171. Rosen,ED, Sarraf,P, Troy,AE, Bradwin,G, Moore,K, Milstone,DS, Spiegelman,BM, Mortensen,RM: PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol.Cell* 4:611-617, 1999
172. Savage,DB, Tan,GD, Acerini,CL, Jebb,SA, Agostini,M, Gurnell,M, Williams,RL, Umpieby,AM, Thomas,EL, Bell,JD, Dixon,AK, Dunne,F, Boiani,R, Cinti,S, Vidal-Puig,A, Karpe,F, Chatterjee,VK, O'Rahilly,S: Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 52:910-917, 2003
173. Ramji,DP, Foka,P: CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem.J.* 365:561-575, 2002
174. Cao,Z, Umek,RM, McKnight,SL: Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 5:1538-1552, 1991

175. Wu,Z, Bucher,NL, Farmer,SR: Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol.Cell Biol.* 16:4128-4136, 1996
176. Freytag,SO, Paielli,DL, Gilbert,JD: Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev.* 8:1654-1663, 1994
177. Lin,FT, Lane,MD: CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:8757-8761, 1994
178. Yeh,WC, Cao,Z, Classon,M, McKnight,SL: Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* 9:168-181, 1995
179. Lin,FT, Lane,MD: Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev.* 6:533-544, 1992
180. Wang,ND, Finegold,MJ, Bradley,A, Ou,CN, Abdelsayed,SV, Wilde,MD, Taylor,LR, Wilson,DR, Darlington,GJ: Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269:1108-1112, 1995
181. Ailhaud,G: Early adipocyte differentiation. *Biochem.Soc.Trans.* 24:400-402, 1996
182. Amri,EZ, Dani,C, Doglio,A, Grimaldi,P, Ailhaud,G: Coupling of growth arrest and expression of early markers during adipose conversion of preadipocyte cell lines. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 137:903-910, 1986

183. Zhang,Y, Proenca,R, Maffei,M, Barone,M, Leopold,L, Friedman,JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432, 1994
184. Fruhbeck,G, Gomez-Ambrosi,J, Muruzabal,FJ, Burrell,MA: The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 280:E827-E847, 2001
185. Baile,CA, Della-Fera,MA, Martin,RJ: Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu.Rev.Nutr.* 20:105-127, 2000
186. De Vos,P, Lefebvre,AM, Miller,SG, Guerre-Millo,M, Wong,K, Saladin,R, Hamann,LG, Staels,B, Briggs,MR, Auwerx,J: Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J.Clin.Invest* 98:1004-1009, 1996
187. Montague,CT, Prins,JB, Sanders,L, Digby,JE, O'Rahilly,S: Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* 46:342-347, 1997
188. Morin,CL, Eckel,RH, Marcel,T, Pagliassotti,MJ: High fat diets elevate adipose tissue-derived tumor necrosis factor-alpha activity. *Endocrinology* 138:4665-4671, 1997
189. Petruschke,T, Hauner,H: Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 76:742-747, 1993

190. Stephens, JM, Pekala, PH: Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J.Biol.Chem.* 266:21839-21845, 1991
191. Xing, H, Northrop, JP, Grove, JR, Kilpatrick, KE, Su, JL, Ringold, GM: TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPARgamma without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology* 138:2776-2783, 1997
192. Vgontzas, AN, Papanicolaou, DA, Bixler, EO, Kales, A, Tyson, K, Chrousos, GP: Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82:1313-1316, 1997
193. Greenberg, AS, Nordan, RP, McIntosh, J, Calvo, JC, Scow, RO, Jablons, D: Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res.* 52:4113-4116, 1992
194. Fasshauer, M, Kralisch, S, Klier, M, Lossner, U, Bluher, M, Klein, J, Paschke, R: Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 301:1045-1050, 2003
195. Grunfeld, C, Feingold, KR: The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy* 3:143-158, 1991
196. Papanicolaou, DA, Petrides, JS, Tsigos, C, Bina, S, Kalogeras, KT, Wilder, R, Gold, PW, Deuster, PA, Chrousos, GP: Exercise stimulates interleukin-6 secretion: inhibition by glucocorticoids and correlation with catecholamines. *Am.J.Physiol* 271:E601-E605, 1996
197. Hu, E, Liang, P, Spiegelman, BM: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J.Biol.Chem.* 271:10697-10703, 1996

198. Fasshauer,M, Klein,J, Neumann,S, Eszlinger,M, Paschke,R: Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 290:1084-1089, 2002
199. Maeda,N, Shimomura,I, Kishida,K, Nishizawa,H, Matsuda,M, Nagaretani,H, Furuyama,N, Kondo,H, Takahashi,M, Arita,Y, Komuro,R, Ouchi,N, Kihara,S, Tochino,Y, Okutomi,K, Horie,M, Takeda,S, Aoyama,T, Funahashi,T, Matsuzawa,Y: Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat.Med.* 8:731-737, 2002
200. Steppan,CM, Bailey,ST, Bhat,S, Brown,EJ, Banerjee,RR, Wright,CM, Patel,HR, Ahima,RS, Lazar,MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312, 2001
201. Rajala,MW, Obici,S, Scherer,PE, Rossetti,L: Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J.Clin.Invest* 111:225-230, 2003
202. Xia,Z, Sniderman,AD, Cianflone,K: Acylation-stimulating protein (ASP) deficiency induces obesity resistance and increased energy expenditure in ob/ob mice. *J.Biol.Chem.* 277:45874-45879, 2002
203. Morton,RE, Nunes,V, Izem,L, Quintao,E: Markedly elevated lipid transfer inhibitor protein in hypercholesterolemic subjects is mitigated by plasma triglyceride levels. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:1642-1649, 2001
204. Izem,L, Morton,RE: Cholesteryl ester transfer protein biosynthesis and cellular cholesterol homeostasis are tightly interconnected. *J.Biol.Chem.* 276:26534-26541, 2001
205. Bach-Ngohou,K, Ouguerram,K, Nazih,H, Maugeire,P, Ripolles-Piquer,B, Zair,Y, Frenais,R, Krempf,M, Bard,JM: Apolipoprotein E

- kinetics: influence of insulin resistance and type 2 diabetes. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 26:1451-1458, 2002
206. Curtiss,LK, Boisvert,WA: Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 11:243-251, 2000
207. Richardson,MA, Berg,DT, Johnston,PA, McClure,D, Grinnell,BW: Human liposarcoma cell line, SW872, secretes cholesteryl ester transfer protein in response to cholesterol. *J.Lipid Res.* 37:1162-1166, 1996
208. Vassiliou,G, Benoist,F, Lau,P, Kavaslar,GN, McPherson,R: The low density lipoprotein receptor-related protein contributes to selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by SW872 liposarcoma cells and primary human adipocytes. *J.Biol.Chem.* 276:48823-48830, 2001
209. Mabile,L, Lefebvre,C, Lavigne,J, Boulet,L, Davignon,J, Lussier-Cacan,S, Bernier,L: Secreted apolipoprotein E reduces macrophage-mediated LDL oxidation in an isoform-dependent way. *J.Cell Biochem.* 90:766-776, 2003
210. 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.* 16:149-159, 1996
211. LOWRY,OH, ROSEBROUGH,NJ, FARR,AL, RANDALL,RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275, 1951
212. Ho,YY, Deckelbaum,RJ, Chen,Y, Vogel,T, Talmage,DA: Apolipoprotein E inhibits serum-stimulated cell proliferation and

- enhances serum-independent cell proliferation. *J.Biol.Chem.* 276:43455-43462, 2001
213. Chen, YC, Pohl, G, Wang, TL, Morin, PJ, Risberg, B, Kristensen, GB, Yu, A, Davidson, B, Shih, I: Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer. *Cancer Res.* 65:331-337, 2005
214. Auboeuf, D, Rieusset, J, Fajas, L, Vallier, P, Frering, V, Riou, JP, Staels, B, Auwerx, J, Laville, M, Vidal, H: Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46:1319-1327, 1997
215. Morrison, RF, Farmer, SR: Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J.Biol.Chem.* 274:17088-17097, 1999
216. Altiock, S, Xu, M, Spiegelman, BM: PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev.* 11:1987-1998, 1997
217. Tamori, Y, Masugi, J, Nishino, N, Kasuga, M: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 51:2045-2055, 2002
218. Jones, JR, Barrick, C, Kim, KA, Lindner, J, Blondeau, B, Fujimoto, Y, Shiota, M, Kesterson, RA, Kahn, BB, Magnuson, MA: Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:6207-6212, 2005

219. Sorrentino,D, Van Ness,K, Stump,D, Berk,PD: Oleate uptake kinetics in the perfused rat liver are consistent with pseudofacilitation by albumin. *J.Hepatol.* 21:551-559, 1994
220. Descamps,O, Bilheimer,D, Herz,J: Insulin stimulates receptor-mediated uptake of apoE-enriched lipoproteins and activated alpha 2-macroglobulin in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 268:974-981, 1993
221. Bluher,M, Wilson-Fritch,L, Leszyk,J, Laustsen,PG, Corvera,S, Kahn,CR: Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 279:31902-31909, 2004
222. Bluher,M, Michael,MD, Peroni,OD, Ueki,K, Carter,N, Kahn,BB, Kahn,CR: Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev.Cell* 3:25-38, 2002
223. Ntambi,JM, Miyazaki,M, Stoehr,JP, Lan,H, Kendziorski,CM, Yandell,BS, Song,Y, Cohen,P, Friedman,JM, Attie,AD: Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:11482-11486, 2002
224. Stremmel,W, Strohmeyer,G, Berk,PD: Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:3584-3588, 1986
225. Yano,T, Kobori,S, Sakai,M, Anami,Y, Matsumura,T, Matsuda,H, Kasho,M, Shichiri,M: Beta-very low density lipoprotein induces triglyceride accumulation through receptor mediated endocytotic pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Atherosclerosis* 135:57-64, 1997

226. Goudriaan, JR, Tacke, PJ, Dahlmans, VE, Gijbels, MJ, van Dijk, KW, Havekes, LM, Jong, MC: Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1488-1493, 2001
227. Ensler, K, Mohammadi, M, Broijers, A, Angelin, B, Gafvels, M: Dexamethasone stimulates very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene expression in differentiating 3T3-L1 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1581:36-48, 2002
228. Deng, T, Shan, S, Li, PP, Shen, ZF, Lu, XP, Cheng, J, Ning, ZQ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Transcriptionally Up-Regulates Hormone-Sensitive Lipase via the Involvement of Specificity Protein-1. *Endocrinology* 147:875-884, 2006
229. Eberle, D, Hegarty, B, Bossard, P, Ferre, P, Foufelle, F: SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86:839-848, 2004
230. Wiggins, D, Gibbons, GF: The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. *Biochem. J.* 284 ( Pt 2):457-462, 1992
231. Byrne, CD, Brindle, NP, Wang, TW, Hales, CN: Interaction of non-esterified fatty acid and insulin in control of triacylglycerol secretion by Hep G2 cells. *Biochem. J.* 280 ( Pt 1):99-104, 1991
232. Dixon, JL, Furukawa, S, Ginsberg, HN: Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from Hep G2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. *J. Biol. Chem.* 266:5080-5086, 1991

233. Thrift,RN, Forte,TM, Cahoon,BE, Shore,VG: Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J.Lipid Res.* 27:236-250, 1986
234. 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* 39:16084-16091, 2000
235. Gibbons,GF, Bartlett,SM, Sparks,CE, Sparks,JD: Extracellular fatty acids are not utilized directly for the synthesis of very-low-density lipoprotein in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem.J.* 287 ( Pt 3):749-753, 1992
236. Lilly-Stauderman,M, Brown,TL, Balasubramaniam,A, Harmony,JA: Heparin releases newly synthesized cell surface-associated apolipoprotein E from HepG2 cells. *J.Lipid Res.* 34:190-200, 1993
237. Duplus,E, Glorian,M, Forest,C: Fatty acid regulation of gene transcription. *J.Biol.Chem.* 275:30749-30752, 2000
238. Huang,ZH, Gu,D, Mazzone,T: Oleic acid modulates the post-translational glycosylation of macrophage ApoE to increase its secretion. *J.Biol.Chem.* 279:29195-29201, 2004
239. Nordby,G, Berg,T, Nilsson,M, Norum,KR: Secretion of lecithin: cholesterol acyltransferase from isolated rat hepatocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 450:69-77, 1976
240. Aalto-Setälä,K, Fisher,EA, Chen,X, Chajek-Shaul,T, Hayek,T, Zechner,R, Walsh,A, Ramakrishnan,R, Ginsberg,HN, Breslow,JL: Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional

- catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J.Clin.Invest* 90:1889-1900, 1992
241. Huang,Y, Liu,XQ, Rall,SC, Jr., Taylor,JM, von Eckardstein,A, Assmann,G, Mahley,RW: Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. *J.Biol.Chem.* 273:26388-26393, 1998
242. Jong,MC, Dahlmans,VE, Hofker,MH, Havekes,LM: Nascent very-low-density lipoprotein triacylglycerol hydrolysis by lipoprotein lipase is inhibited by apolipoprotein E in a dose-dependent manner. *Biochem.J.* 328 ( Pt 3):745-750, 1997
243. Rensen,PC, Van Berkel,TJ: Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* 271:14791-14799, 1996
244. Hannon,GJ: RNA interference. *Nature* 418:244-251, 2002
245. Freedman,BD, Lee,EJ, Park,Y, Jameson,JL: A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor-gamma knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome. *J.Biol.Chem.* 280:17118-17125, 2005
246. Burgess,JW, Liang,P, Vaidyanath,C, Marcel,YL: ApoE of the HepG2 cell surface includes a major pool associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *Biochemistry* 38:524-531, 1999
247. Boden,G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46:3-10, 1997

ANNEXE II  
ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

**A) Déclaration des coauteurs d'un article**

**1. Identification de l'étudiant et du programme**

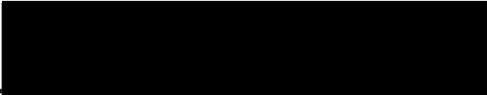
Carmel, Jean-François  
2-484-1-0, sciences biomédicales

**2. Description de l'article**

Carmel JF, Bernier L, Davignon J et Cohn JS. Effect of Apolipoprotein E Overexpression on Differentiation of Human SW872 Liposarcoma Cells. J Biol Chem [phase finale de préparation (sera soumis en juillet 2005)].

**3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-François Carmel incluse cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Effets d'une surexpression de l'apolipoprotéine E dans les cellules humaines HepG2 et SW872.

<u>Lise Bernier</u> Coauteur	 Signature	<u>21-06-2005</u> Date
<u>Jean Davignon</u> Coauteur	 Signature	<u>21 06 2005</u> Date
<u>Jeffrey S. Cohn</u> Coauteur	 Signature	<u>10-6-2005</u> Date

## PUBLICATIONS ET PRÉSENTATIONS

### Articles

1. Dagenais A, Fréchette R, Yamagata T, Yamagata T, Carmel JF, Clermont ME, Brochiero E, Masse C, Berthiaume Y. **Downregulation of ENaC activity and expression by TNF $\alpha$  in alveolar epithelial cells.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004, 286: L301-L311.
2. Carmel JF, Bernier L, Davignon J and Cohn JS. **Apolipoprotein E promotes cell proliferation and inhibits maturation of human adipocytes.** (sera soumis sous peu à J Biol Chem)

### Résumés

1. Carmel JF, Bernier L, Davignon J et Cohn JS. **Une surexpression de l'apoE entraîne une hausse de la croissance cellulaire et une réduction de lipides dans les cellules de Liposarcome humain SW872.** 6<sup>ème</sup> réunion de la société québécoise de lipidologie, de nutrition et du métabolisme (SQLNM). Médecine Sciences 2005, 3 (21), pp.xiii.
2. Carmel JF, Brissette L, Davignon J, Bernier L et Cohn JS. **Effet de l'apoE sur l'incorporation d'acide gras et le métabolisme des cellules humaines HepG2.** 6<sup>ème</sup> réunion de la société québécoise de lipidologie, de nutrition et du métabolisme (SQLNM). Médecine Sciences 2005, 3 (21), pp.vi.
3. Carmel JF, Bernier L, Davignon J et Cohn JS. **Effets d'une surexpression stable de l'apoE sur la croissance cellulaire et l'accumulation de lipides par les adipocytes humains.** Médecine Sciences. 2004, 3 (20), pp.viii.
4. Carmel JF, Dagenais A et Berthiaume Y. **Les cellules A549, un modèle représentatif des cellules AT II pour la régulation de  $\alpha$ ENaC par le TNF- $\alpha$ .** Médecine Sciences. 2002, vol.2, suppl. 2, p.66.

### Conférences

1. Carmel JF, Berthiaume Y et Dagenais A. **Les cellules A549, un modèle représentatif des cellules AT II pour la régulation de  $\alpha$ ENaC par le TNF- $\alpha$ .** Congrès des stagiaires de recherche en santé de la faculté de médecine, du CHUM et des Centres hospitaliers et instituts affiliés à l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Janvier 2003 (Présentation orale).
2. Carmel JF, Bernier L, Davignon J et Cohn JS. **Une surexpression de l'apoE entraîne une hausse de la croissance cellulaire et une réduction de lipides dans les cellules de Liposarcome humain SW872.** Journée de la recherche de l'IRCM, Montréal, Québec, Mai 2005 (Affiche).

3. Carmel JF, Bernier L, Davignon J et Cohn JS. **Une surexpression de l'apoE engendre une hausse de la croissance cellulaire et une réduction de lipides dans les adipocytes humains.** Colloque Santé Vasculaire et Rénale, Québec, Mai 2005.
4. Carmel JF, Bernier L, Davignon J et Cohn JS. **Une surexpression de l'apoE entraîne une hausse de la croissance cellulaire et une réduction de lipides dans les cellules de Liposarcome humain SW872.** 6<sup>ème</sup> réunion de la société québécoise de lipidologie, de nutrition et du métabolisme (SQLNM), Québec, Avril 2005 (Affiche).
5. Carmel JF, Brissette L, Davignon J, Bernier L et Cohn JS. **Effet de l'apoE sur l'incorporation d'acide gras et le métabolisme des cellules humaines HepG2.** 6<sup>ème</sup> réunion de la société québécoise de lipidologie, de nutrition et du métabolisme (SQLNM), Québec, Avril 2005 (Affiche).
6. Carmel JF. **L'apolipoprotéine E: une solution pour contrer l'obésité?** 1<sup>er</sup> Salon national de la recherche universitaire, Montréal, Avril 2005 (Affiche).
7. Carmel JF, Bernier L, Davignon J et Cohn JS. **Effect of apoE overexpression on cellular growth and lipid accumulation in human SW872 liposarcoma cells.** 29<sup>th</sup> Annual Canadian Lipoprotein Conference, Banff, Alberta, October 2004 (Affiche).
8. Carmel JF, Bernier L, Davignon J et Cohn JS. **Effets d'une surexpression stable de l'apoE sur la croissance cellulaire et l'accumulation de lipides par les adipocytes humains.** Journée de la recherche de l'IRCM, Montréal, Québec, Septembre 2004 (Affiche).
9. Carmel JF, Bernier L, Davignon J et Cohn JS. **Effets d'une surexpression stable de l'apoE sur la croissance cellulaire et l'accumulation de lipides par les adipocytes humains.** 5<sup>ème</sup> réunion de la société québécoise de lipidologie, de nutrition et du métabolisme (SQLNM), Québec, Avril 2004 (Affiche).
10. Carmel JF, Auclair-Raiche E, Brissette L, Davignon J, Bernier L and Cohn JS. **Effect of apoE on fatty acid uptake and metabolism by human HepG2 cells.** 28<sup>th</sup> Annual Canadian Lipoprotein Conference, Muskoka, Ontario, October 2003.

#### Bourses et distinctions

Prix de la meilleure présentation par affiche, Colloque Santé Vasculaire et Rénale. Québec, Mai 2005.

Prix de la meilleure présentation par affiche, Congrès de la société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme (SQLNM). Québec, avril 2005.

Finaliste au concours national de vulgarisation scientifique dans la catégorie Sciences de la vie et de la Santé. 1<sup>er</sup> Salon national de la recherche universitaire. Montréal, Avril 2005.

Bourse de rédaction, Comité des études supérieures  
Faculté de Médecine, Sciences biomédicales  
Université de Montréal, 2005 (dossier académique)