

Université de Montréal

**Fonction de la glycoprotéine *Golgi apparatus protein 1* (GLG1)
dans la différenciation des adipocytes et l'effet de la forme de
type sauvage et la forme tronquée de GLG1 sur le métabolisme
des lipides**

Par :
Alisar Katbe

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en sciences
pharmaceutiques

Option : Découverte et validation de cibles thérapeutiques

Août 2020

© Alisar Katbe, 2020

Université de Montréal

Faculté de pharmacie

Ce mémoire intitulé

Fonction de la glycoprotéine *Golgi apparatus protein 1* (GLG1) dans la différenciation des adipocytes et l'effet de la forme de type sauvage et la forme tronquée de GLG1 sur le métabolisme des lipides

Présenté par :
Alisar Katbe

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Pr Davide Brambilla

Président-rapporteur

Pr Gaétan Mayer

Directeur de recherche

Pr Xavier Banquy

Membre du jury

Résumé

Golgi apparatus protein 1 (GLG1) est une protéine transmembranaire de 160 kDa qui interagit avec l'apolipoprotéine B100 (apoB100), le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) et la *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* (PCSK9). Cependant, son mécanisme d'action et sa régulation post-traductionnelle sont inconnus. Des études ont montré que GLG1 subit deux clivages résultant en fragments solubles sécrétés de 150 kDa et 55 kDa. Dans cette étude, notre premier objectif est d'identifier les enzymes responsables de la protéolyse de GLG1 ainsi que l'effet du clivage sur sa fonction dans le métabolisme des lipides. De plus, les résultats de nos collaborateurs montrent que les souris adultes déficientes en GLG1 ont un plus grand nombre d'adipocytes mais de taille plus petite que les souris de type sauvage. Notre deuxième objectif est de mesurer la variation de l'expression ainsi qu'identifier l'effet de GLG1 lors de la différenciation des fibroblastes en adipocytes. Pour le premier objectif, les cellules HEK293T surexprimant GLG1 ont été soit transfectées avec des convertases de proprotéines (PCSK) soit incubées avec différents inhibiteurs d'enzymes. Les milieux et les lysats cellulaires ont été analysés par immunobuvardage à la Western. Il n'y a pas eu de nouveaux fragments générés en présence des PCSK. Cependant, en présence d'inhibiteurs des sérines protéases apparentées à la trypsine soit AEBSF et Gabexate mesylate, il y a eu une réduction de la formation du fragment de 55 kDa. Pour identifier la métalloprotéase responsable du clivage de l'ectodomaine générant le fragment de 150 kDa, GLG1 a été transfectée avec les *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase* (TIMP 1-4). Nos résultats ont montré que TIMP3 empêche la relâche de l'ectodomaine de GLG1 dans le milieu de culture. Finalement, nos analyses de plasma de souris par immunobuvardage à la Western ont montré la présence des fragments de 150 kDa et 55 kDa de GLG1 *in vivo*. Pour le deuxième objectif de l'étude, les fibroblastes préadipocytaires de souris 3T3-L1 ont été différenciés en adipocytes. Des lysats cellulaires et l'isolation d'ARN ont été effectués aux jours 0, 2, 4, 6, 8 et 10 de la différenciation. Des immunobuvardages à la Western ainsi que des RT-qPCR ont été réalisés pour analyser l'expression de GLG1 au cours de la différenciation. Nos résultats ont montré que l'expression de GLG1 augmente durant la différenciation. Bref, nos résultats démontrent que des enzymes *trypsin-like* clivent GLG1 et génèrent le fragment de 55 kDa. L'inhibition du clivage de l'ectodomaine de GLG1 par TIMP3 suggère que les ADAMs sont impliquées dans la relâche du fragment de 150 kDa. De plus, nous avons montré que l'expression de GLG1 augmente au cours de la différenciation adipocytaire.

Mots clés : GLG1, *Golgi apparatus protein 1*, ESL-1, CFR, LDL-C, apoB100, PCSK9, TIMP3, sérines protéases apparentées à la trypsine, adipocytes, différenciation

Abstract

Golgi apparatus protein 1 (GLG1) is a 160 kDa transmembrane protein interacting with apolipoprotein B100 (apoB100), low-density lipoprotein receptor (LDLR) and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). However, the protein's post-translational regulation and mechanism of action are poorly understood. Previous studies showed that GLG1 is cleaved resulting in two fragments of 150 kDa and 55 kDa secreted at the cell surface and in the extracellular matrix. The first objective of this study is to identify enzymes responsible for GLG1 proteolysis and the effect of cleavage on its function in lipid metabolism. Furthermore, our collaborators showed that mice with GLG1 knockout have a higher number of adipocytes, but those cells are smaller in size compared to those in wild type mice. Therefore, the second objective of the study is to measure the variation of GLG1 expression during adipocytes differentiation and to identify the effects of GLG1 knockout on adipocytes differentiation. For the first objective, HEK293T cells overexpressing GLG1 were either transfected with basic amino acid-specific proprotein convertases (PCSK) or treated with enzyme inhibitors. Media and cell lysates were analyzed by Western blot. No new fragments were detected in media of PCSK-transfected cells. Cell treatment with trypsin-like serine proteases inhibitors, AEBSF and Gabexate mesylate, reduced the secretion of the 55 kDa fragment. To identify the metalloproteinase responsible for GLG1 shedding, GLG1 was co-transfected with Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMP1-4). Our results showed that TIMP3 inhibits shedding of the 150 kDa fragment. Finally, wild-type mouse plasma was analyzed by Western blot and showed the presence of both fragments *in vivo*. For the second objective of the study, fibroblasts 3T3-L1 cells were differentiated into adipocytes and GLG1 mRNA and protein expression were measured at day 0, 2, 4, 6, 8 and 10 by qPCR and Western Blot. Our results showed that GLG1 expression increased during differentiation and a peak was observed at day 4. To conclude, in the first objective of our study, our results showed that trypsin-like enzymes cleave GLG1 and produce a 55 kDa fragment. Shedding of GLG1 is inhibited by TIMP3, which suggests that ADAM10 or ADAM17 are involved in the release of the 150 kDa fragment. In addition, both 55 kDa and 150 kDa fragments were found in normal mouse plasma supporting the relevance of our findings *in vivo*. In the second objective of our study, GLG1 expression increased during adipocyte differentiation suggesting a role in adipose tissue development and/or morphology. In conclusion, our study will help elucidate how proteolysis of GLG1 impacts its role in the regulation of apoB and PCSK9 secretion and lipid metabolism and how can GLG1 expression affect adipocytes differentiation.

Key words : GLG1, Golgi apparatus protein 1, ESL-1, CFR, LDL-C, apoB100, PCSK9, TIMP3, Trypsin-like, adipocytes, differentiation

Table des Matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	X
REMERCIEMENTS	XVI
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION.....	1
1.1 MÉTABOLISME DES LIPIDES	1
1.1.1 Lipoprotéines	1
1.1.2 Métabolisme du cholestérol	4
1.1.2.1 Voie Exogène	6
1.1.2.1.1 Digestion et absorption	6
1.1.2.1.2 Chylomicrons	7
1.1.2.2 Voie endogène	8
1.1.2.2.1 Synthèse du cholestérol	8
1.1.2.2.2 VLDL.....	10
1.1.2.2.3 LDL.....	11
1.1.2.3 Transport inverse du cholestérol	13
1.1.2.3.1 HDL et clairance du cholestérol	13
1.2 MALADIES IMPLIQUANT LA DYSLIPIDÉMIE.....	13
1.2.1 Obésité, dyslipidémie et maladies cardiovasculaires.....	14
1.2.1.1 Obésité.....	14
1.2.1.2 Adipocytes, adipocytokines et les maladies cardiovasculaires.....	14
1.2.1.3 Adipogénèse	17
1.2.2 Athérosclérose	19
1.2.2.1 Dysfonction endothéliale.....	19
1.2.2.2 Formation de la plaque d'athérosclérose	20
1.2.2.3 Formation d'un thrombus.....	22
1.2.2.4 Traitements.....	23
1.2.2.4.1 Traitements non-médicamenteux	23
1.2.2.4.2 Traitements médicamenteux	25
1.2.3 Hypercholestérolémie	29
1.2.3.1 Mutations autosomiques dominantes causant l'hypercholestérolémie familiale.....	30
1.2.3.1.1 Mutations du LDLR	30
1.2.3.1.2 Mutations de l'apoB	31
1.2.3.1.3 Mutation de PCSK9.....	32
1.2.3.1.4 Mutation au locus HCHOLA4	34
1.3 GOLGI APPARATUS PROTEIN 1 (GLG1)	34
1.3.1 GLG1	34
1.3.2 Rôles de GLG1	35
1.3.2.1 Rôle de GLG1 dans l'athérosclérose	35
1.3.2.1.1 GLG1 et le roulement leucocytaire.....	35
1.3.2.1.2 GLG1 et l'athérosclérose	36
1.3.2.1.3 GLG1 et l'adiponectine	37
1.3.2.2 GLG1 et le métabolisme des lipides.....	37
1.3.2.3 GLG1 et le développement du squelette	38
1.3.2.3.1 GLG1 et l'interaction avec FGF18	38
1.3.2.4 GLG1 et l'obésité.....	39

1.3.2.4.1 GLG1 et l'interaction avec Preadipocytes factor 1	39
1.3.2.4.2 GLG1 et la formation d'adipocytes	39
1.3.3 Clivage de GLG1	39
1.4 ENZYMES POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉES DANS LE CLIVAGE DE GLG1	41
1.4.1 Protéases à sérine	41
1.4.1.1 PCSK	41
1.4.1.1.1 Activité et clivage	41
1.4.1.1.2 Localisation, distribution tissulaire et fonction in vivo	42
1.4.1.1.3 Activation des convertases de proprotéines	44
1.4.1.2 Protéases à sérine apparentées à la trypsine	45
1.4.2 Les métalloprotéases matricielles	46
1.4.2.1 Membres de la famille des métalloprotéases matricielles	47
1.4.2.2 Les inhibiteurs des métalloprotéases : TIMP	48
CHAPITRE 2 : OBJECTIF DU MÉMOIRE	50
CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES	51
3.1. CONSTRUCTION DES PLASMIDES D'EXPRESSION	51
3.1.1 GLG1	51
3.1.1.1 Mutations	51
3.1.2 PCSK	52
3.1.3 pU6-shGLG1, pAAV-mGLG1-HA et pZAC2.1-mGLG1-HA	52
3.2 LIGATION ET PURIFICATION	53
3.3. TRANSFORMATION BACTÉRIENNE ET ISOLATION DU PLASMIDE	54
3.3.1 DH5 α TM	54
3.3.2 Stb13 TM	55
3.4 CULTURE CELLULAIRE	55
3.4.1 HEK 293T	55
3.4.2 3T3-L1	56
3.5. TRANSFECTION	56
3.5.1 GLG1 et PCSK	56
3.5.2 GLG1 et TIMP	57
3.6 INHIBITEURS	57
3.7 DÉGLYCOSYLATION	57
3.8 RÉDUCTION DE L'EXPRESSION D'ADAM17 À L'AIDE D'UN siRNA	58
3.9 IMMUNOBUVARDAGE À LA WESTERN	59
3.10 EXTRACTION D'ARN, RT-PCR ET qPCR	61
3.11 PRÉPARATION DES VIRUS AAV8	62
3.12 INJECTION DES SOURIS ET ANALYSE	63
3.13 EXPRESSION DE GLG1 DANS LE PLASMA	65
3.14 DIFFÉRENCIATION DES ADIPOCYTES	65
3.15 QUANTIFICATION DES LIPIDES	66
3.16 MICROSCOPIE CONFOCALE	67
3.17 DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE GLG1 DANS LES CELLULES 3T3-L1 À L'AIDE D'UN siRNA	68
CHAPITRE 4: RÉSULTATS	69
4.1 CLIVAGE DE GLG1-HA	69
4.1.1 In vitro	69
4.1.1.1 Le decCMK inhibe la sécrétion de GLG1	69
4.1.1.2. Les convertases de proprotéines ne sont pas directement responsables du clivage de GLG1	70
4.1.1.3 GLG1 est clivée en présence de GM6001 et Marimastat	71
4.1.1.4 L'AEBSF inhibe la sécrétion de GLG1	73
4.1.1.5 Le Gabexate mesylate inhibe la relargage du fragment de 55 kDa de GLG1 dans le milieu extracellulaire	74
4.1.1.6 Mutagenèse de GLG1 permettant d'identifier les sites de clivage	76

4.1.1.7 Inhibition du clivage de l'ectodomaine de GLG1 par TIMP3.....	77
4.1.1.8 Le fragment de 150 kDa de GLG1 ne semble pas être généré par ADAM17	78
4.1.1.9 Caractérisation de la glycosylation des fragments de GLG1	80
4.1.2 Expériences <i>In vivo</i> chez les souris	81
4.1.2.1 Présence de deux fragments de GLG1 dans le plasma de souris.....	82
4.1.2.2 Analyse des extraits de foie des souris injectées avec AAV8-mGLG1-HA.....	83
4.1.2.3 Analyse de l'expression et de la sécrétion d'apoB48 et apoB100 chez les souris surexprimant GLG1-HA	84
4.2 GLG1 ET LA DIFFÉRENCIATION DES ADIPOCYTES	85
4.2.1 L'expression protéique de GLG1 varie significativement au cours de la différenciation des fibroblastes en adipocytes.....	85
4.2.1.2 Analyse de l'expression de l'ARNm de GLG1 au cours de la différenciation	88
4.2.1.3 Quantification des lipides et détection des gouttelettes lipidiques et de GLG1 par immunofluorescence dans les adipocytes	92
4.2.1.4 <i>Knockdown</i> de GLG1 dans les cellules 3T3-L1.....	92
CHAPITRE 5 : DISCUSSION	95
5.1 CLIVAGE DE GLG1	95
5.2 DIFFÉRENCIATION DES ADIPOCYTES	100
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	104
ANNEXES.....	126
ANNEXE 1.....	126
ANNEXE 2.....	133

Liste des figures

Figure 1 : Proportions des différentes molécules composant les lipoprotéines	2
Figure 2 : Structure d'une lipoprotéine.....	2
Figure 3 : Le métabolisme du cholestérol et son transport	5
Figure 4 : Transport du cholestérol jusqu'au réticulum endoplasmique.....	7
Figure 5 : Voie de signalisation de SCAP-SREBP dans la synthèse du cholestérol	10
Figure 6 : Structure du récepteur des lipoprotéines de basse densité	12
Figure 7 : L'internalisation du complexe LDL-LDLR	12
Figure 8 : Adipogénèse : Différenciation des fibroblastes en cellules adipeuses	17
Figure 9 : Les cinq classes de mutations du LDLR	31
Figure 10 : L'effet des mutations gain de fonction de PCSK9 sur l'internalisation de LDLR	33
Figure 11 : Schéma représentatif de la structure primaire de GLG1	35
Figure 12 : Inhibition du clivage de GLG1 par Décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlorométhyl cétone (DecCMK).....	70
Figure 13 : Absence de clivage complet ou de nouveaux fragments de GLG1 en présence des différentes PCSK.	71
Figure 14 : GLG1 est clivée en présence de GM6001 et de Marimastat.....	73
Figure 15 : Inhibition du clivage de GLG1 par l'AEBSF.....	74
Figure 16 : Inhibition du clivage de GLG1 par Gabexate mesylate.	75
Figure 17 : Les mutations des acides aminés basiques R423A-R424A, R453A-K454A et R606A-R607A	76
Figure 18 : Inhibition du clivage de l'ectodomaine de GLG1 avec TIMP3.	78
Figure 19 : Le fragment de 150 kDa de GLG1 ne semble pas être généré par ADAM17	79
Figure 20 :Caractérisation de la glycosylation des fragments de GLG1.	80
Figure 21 : Schéma de la structure primaire de GLG1 avec les sites de détection des anticorps anti-HA et anti h/mGLG1	82
Figure 22 : Fragments de GLG1 dans le plasma de souris C57BL/6.	83
Figure 23 : Analyse des extraits de foie des souris surexprimant mGLG1-HA.	84
Figure 24 : Analyse de l'expression et la sécrétion relative moyenne d'apoB48 et apoB100 chez les souris injectées avec AAV8-vide et AAV8-mGLG1-HA.	85
Figure 25 : Expression protéique de GLG1 dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.	87
Figure 26 : Augmentation de l'expression protéique moyenne relative de CD36 dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.....	88
Figure 27 : Expression moyenne relative de l'ARNm de GLG1 dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.	90
Figure 28 : : Expression moyenne relative de l'ARNm de PPAR γ ₂ dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.....	90
Figure 29 : : Expression moyenne relative de de l'ARNm de C/EBP α dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.....	91
Figure 30 : Expression moyenne relative de l'ARNm de Pref-1 dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.	91
Figure 31 : Immunolocalisation de GLG1 et de LDLR observée par microscopie confocale à fluorescence.	92

Figure 32 : Diminution de l'expression de GLG1 à l'aide d'un siRNA dans les cellules 3T3-11	93
Figure 33 : Diminution de l'expression de GLG1 à l'aide d'un siRNA dans les cellules 3T3-L1 dure environ 72 heures.....	94

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taille et composition des lipoprotéines en apolipoprotéines (3)	4
Tableau 2 : Effet des inhibiteurs DecCMK et GM6001 sur la sécrétion des fragments de GLG1 selon l'étude menée par Antoine <i>et al.</i>	40
Tableau 3 : Distribution tissulaire, motif de clivage et effet du <i>knockout</i> des différentes convertases de proprotéines (165)	44
Tableau 4 : Concentrations des virus AAV8	63
Tableau 5: Volume d'injection de virus et de solution saline 0,9% pour chaque plasmide	64

Liste des sigles et abréviations

°C : degré Celsius

A : Alanine

Å : Ångström

aa : Acide aminé

AAV : Virus adéno-associé

ABC : *ATP-binding cassette*

ABCA1 : *ATP-binding cassette transporter A1*

AC : Adénylate cyclase

ACAT : *Acyl-CoA cholesterol acyltransferase*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADAM10 : *A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*

ADAM17 : *A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17*

AdipoR: Récepteur de l'APN

AEBSF : *4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride*

Akt : Protéine kinase B

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

aP2 : *Adipocyte protein 2*

AP2 : *Activating protein 2*

APJ : *Apelin receptor*

Apo : Apolipoprotéine

Apobec-1 : *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1*

APN : Adiponectine

ANGPTL4 : *Angiopoietin-like 4*

ATGL : *Adipose triglyceride lipase*

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*

BMP : *Bone morphogenetic protein*

BSA : Albumine de sérum bovin (*Bovin serum albumin*)

C/EBP α : *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*
CE : Esters de cholestérol
CD31 : *Cluster of differentiation 31*
CD36 : *Cluster of differentiation 36*
CD44 : *Cluster of differentiation 44*
CD68 : *Cluster of differentiation 68*
CFR: *Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor*
cm² : Centimètre carré
CO₂ : Dioxyde de carbone
CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
CRP : Protéine C-réactive
CS : Sérum de veau
Dec-RVKR-CMK/Dec-CMK : Décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlorométhyl cétone
Dlk : *Delta-like protein (Pref-1)*
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DTT : Dithiothréitol
EGF(A) : Facteur de croissance épidermique A (epidermal growth factor precursor homology domain A)
EL : Lipase endothéliale
eNOS : synthase d'oxyde nitrique endothéliale
ESL-1 : *E-selectin ligand-1*
f : Amorce Sens (*Forward primer*)
FATP : *Fatty acid transport proteins*
FBS : Sérum de veau fœtal
FDB : *Familial defective apolipoprotein B100*
FGF : *Fibroblast growth factor*
Fuc : α 1,3-fucosyltransférases
G : Glycine
g : Accélération radiale
GC : Guanylate cyclase
GDFII : Growth differentiation factor 11

GLG1 : *Golgi glycoprotein 1*

GLUT 4 : Transporteur de glucose 4

GHRH : Hormone de libération de l'hormone de croissance (*Growth Hormone Releasing Hormone*)

GM-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GTP : Guanosine triphosphate

H : Histidine

h : Heure

HA : Épitope dérivé de la glycoprotéine *Human influenza hemagglutinin*

HDL : Lipoprotéines de haute densité

HF : Hypercholestérolémie familiale

HMG-CoA réductase : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase

HPRT : *Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*

HRP : Peroxydase de raifort

I : Isoleucine

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

ICAM : Molécule d'adhésion intercellulaire (*Intercellular adhesion molecule*)

IDL : Lipoprotéines de densité intermédiaire

IL : Interleukine

IFN- γ : Interféron gamma

INSIG : *Insuline-induced gene*

IP : Immunoprécipitation

IV : Intraveineux

K : Lysine

kDa : kiloDalton

kg/m² : kilogramme par mètre carré (indice de masse corporelle)

L : Leucine

LAL : *Lysosomal acid lipase*

LCAT : *Lecithin-cholesterol acyltransferase*

LDL : Lipoprotéine de basse densité

LDL-C : LDL-cholestérol
LDLR : Récepteur des LDL
LDLRAP1 : protéine adaptatrice 1 des LDLR
LFA-1 : *Lymphocyte function-associated antigen 1*
LNP : Nanoparticules lipoïdes
LOX-1 : *Oxidized low-density lipoprotein receptor 1/lectin-type oxidized LDL receptor 1*
Lp(a) : Lipoprotéine (a)
LPL : Lipoprotéine lipase
LRP : *LDLR related proteins*
LTBP-1 : *Latent transforming growth factor- β complex*
M-CSF : Facteur stimulant les colonies de macrophages
MCP-1 : *Monocyte Chemoattractant Protein-1*
MCV : Maladies cardiovasculaires
mg : Milligramme
MG-160 : *Golgi Apparatus protein 1*
mL : Millilitre
mM : Millimolaire
mm : Millimètre
MMP : Métalloprotéase matricielle
MTP : *Microsomal triglyceride transfer protein*
N : Nombres d'essais
n : Nombres d'échantillons
NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate réduit
NLRP3 : *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*
nM : Nanomolaire
NO : Oxyde nitrique
NPC1/NPC2 : Protéines membranaires Niemann-Pick type C1/C2
NPCL1 : Protéines membranaires Niemann-Pick type C1 like 1
ORO : Oil-Red-O
P : Proline
pb : Paire de bases

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PCSK : *Proprotein convertase subtilisin/kexin*

PCSK6 : *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6*

PCSK9 : *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*

PDGF : *Platelet-derived growth factor*

PEI : polyéthylèneimine

PEPCK: Phosphoénolpyruvate carboxykinase

PPAR γ_2 : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2*

Pref-1: *Preadipocyte factor 1*

PSGL-1: *P-selectin glycoprotein-1*

Q : Glutamine

qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative

r : Amorce Anti-sens (*Reverse primer*)

R : Arginine

RCT : Transport inverse du cholestérol (*Reverse cholesterol transport*)

RE : Réticulum endoplasmique

RISC : *RNA-induced silencing complex* (Complexe de silençage induit par l'ARN)

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

Rpm : Tour par minute

RT : Transcription inverse

S1P : *Site-1 protease* (SKI-1)

S2P : *Site-2 protease*

SCAP : *SREBP cleavage-activating protein*

SDS : Dodécylsulfate de sodium

Serca2a : *Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2a*

shRNA : Petits ARN en épingle à cheveux

shCTL : Petits ARN en épingle à cheveux utilisé comme contrôle

shGLG1 : Petits ARN en épingle à cheveux visant à réduire l'expression de GLG1

siRNA : Petit ARN interférent (*small interfering RNA*)

siADAM17: Petit ARN interférent visant à réduire l'expression d'ADAM17

siCTL : Petit ARN interférent utilisé comme contrôle
siGLG1: Petit ARN interférent visant à réduire l'expression de GLG1
SKI-1 : Subtilisin Kexin Isozyme-1
sLe^x-like : Sialyl Lewis x
SR-A : *Scavenger receptor-A*
SR-B1 : *Scavenger receptor-B1*
SRE : *Sterol response element*
SREBP : *Sterol regulatory element-binding proteins*
sscDNA : ADN complémentaire formé d'un seul brin
T75 : Flasque de 75 cm²
TBP : *TATA binding protein*
TG : Triglycérides
TGF- β : *Transforming Growth Factor-beta*
TIMP : *Tissue inhibitors of metalloproteinase* (Inhibiteurs des métalloprotéases)
TNF-α : *Tumour necrosis factor alpha*
TBS : Solution saline tris tamponnée
VCAM-1 : Molécule d'adhésion aux cellules vasculaires 1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*)
VG : Génome viral
VLA-4 : *Very late antigen-4*
VLDL : Lipoprotéine de très basse densité
VLP : Particules apparentées aux virus (*Virus-like particles*)
VSMC : Cellules musculaires lisses des vaisseaux
WB : *Western Blot*
WT : Type sauvage (*wild type*)
ug : Microgramme
uL : Microlitre
uM : Micromolaire
X: Représente tous les acides aminés

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur Dr. Gaétan Mayer pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour mon stage de fin de baccalauréat. Ce stage m'a fait redécouvrir mon amour pour les sciences. Je le remercie aussi de m'avoir fait confiance pour continuer à la maîtrise et de m'avoir donné un projet intéressant sur lequel j'ai adoré travailler. Merci pour les conseils et la supervision lors de mes deux belles années à la maîtrise.

Je souhaite aussi remercier les membres du laboratoire, Annie Demers pour m'avoir accompagnée tout au long de mon stage et de ma maîtrise et Nadine Ardo pour son aide et ses encouragements.

J'aimerais aussi remercier Azadeh Alikashani de la plateforme de biologie moléculaire. Je la remercie de m'avoir introduit à toutes les techniques de clonage et de m'avoir fait confiance pour travailler dans son laboratoire pour les différentes parties de mon projet.

Je remercie aussi les membres de mon jury pour le temps qu'ils ont accordé pour la correction mon mémoire. Je remercie aussi les membres de mon comité consultatif, Dre Marie Lordkipanidzé et Dre Céline Fiset, qui ont pris le temps d'écouter ma présentation sur le projet et qui m'ont conseillé sur la continuation de mon projet.

Finalement, mon dernier remerciement va à ma famille et mes amis. Merci pour vos encouragements et de m'avoir écouté parler pendant des longues heures sur mon projet. J'aimerais remercier particulièrement ma mère et mon père. Je remercie ma mère de m'avoir introduit à la biologie dès mon jeune âge et de m'avoir donné son amour pour ce domaine et mon père pour avoir été le premier à me soutenir dans la poursuite de mes rêves.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Métabolisme des lipides

1.1.1 Lipoprotéines

Les lipides sont des molécules organiques qui sont solubles dans les solvants organiques et insolubles dans l'eau, ce qui comprend les milieux biologiques aqueux tel que le plasma et le sang (1). Ce groupe est formé d'un ensemble hétérogène de molécules tel que les acides gras, les phospholipides et les stérols (1). The Lipid Library classifie ces molécules en lipides simples ou en lipides complexes. Pour les lipides simples, ceux-ci résultent en deux produits après une hydrolyse, cette classe inclut les stérols. Le deuxième groupe est formé de lipides complexes dont l'hydrolyse résulte en trois produits ou plus. Cette classe inclut les glycerophospholipides (1, 2). Puisque les lipides ne sont pas solubles dans les milieux aqueux, ils sont alors transportés dans le plasma sous forme de particules de lipoprotéines qui sont miscibles dans le milieu aqueux (3). Les lipoprotéines sont formées de triglycérides (TG), de phospholipides, d'ester de cholestérol, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (apo) (3).

Les lipoprotéines sont divisées en sept classes en fonction de leur taille, de leur composition en apolipoprotéines et de leur composition lipidique (Figure 1) (3,4). Le centre de la particule de lipoprotéine est hydrophobe et contient des lipides qui sont non-polaires tel que les esters de cholestérol et les TG (Figure 2) (3, 5). Ce centre est entouré d'une membrane hydrophile dont la composition lipidique inclut les phospholipides et le cholestérol libre (Figure 2) (5). Les dernières composantes de la membrane sont les apolipoprotéines (3).

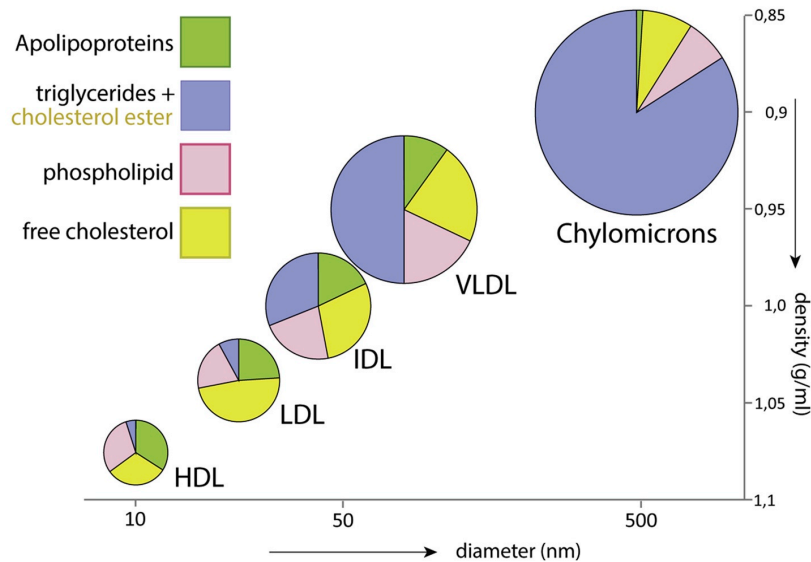


Figure 1 : Proportions des différentes molécules composant les lipoprotéines

La densité des lipoprotéines est déterminée par leur composition relative en lipides et en protéines. Plus les lipoprotéines contiennent des lipides, plus leur densité diminue. Plus les lipoprotéines contiennent des protéines, plus leur densité augmente (6,7).

HDL : Lipoprotéine à haute densité, IDL : Lipoprotéine de densité intermédiaire, LDL : lipoprotéine de basse densité, VLDL : Lipoprotéine de très basse densité

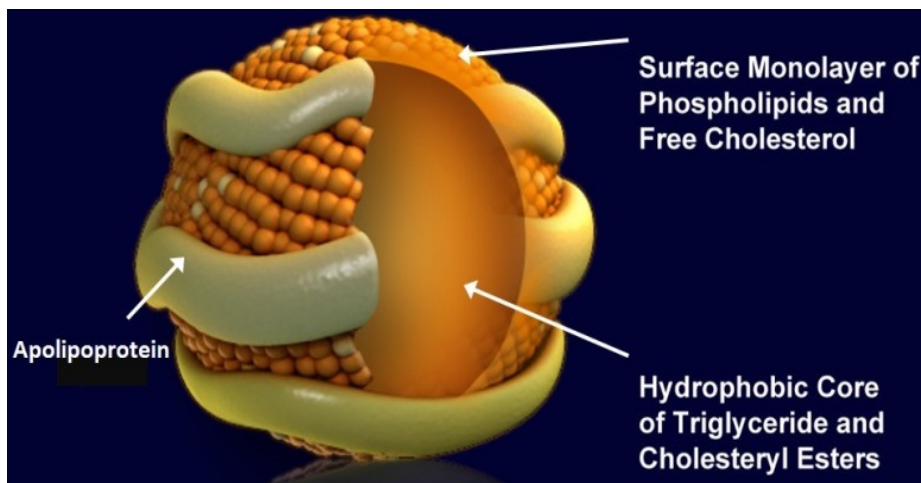


Figure 2 : Structure d'une lipoprotéine

Le centre de la lipoprotéine est hydrophobe et contient des lipides tel que les triglycérides et les esters de cholestérol. La surface est recouverte d'une couche de lipides amphiphiles tel que les phospholipides et des particules de cholestérol non-estérifiées. Finalement, la couche extérieure possède une ou plusieurs apolipoprotéines. Ces apolipoprotéines vont conférer à la lipoprotéine sa structure et sa fonction (3, 8).

Les apolipoprotéines sont des protéines qui s'associent et sont transportées dans les particules de lipoprotéines (Tableau 1). Les apolipoprotéines possèdent quatre fonctions principales (3).

1. Elles sont les ligands qui permettent la liaison des lipoprotéines à leurs récepteurs.
2. Elles guident la formation de lipoprotéines
3. Elles servent de support structurel pour les lipoprotéines
4. Elles peuvent activer ou inhiber certaines enzymes tel que *Lecithin-cholesterol acyltransferase* (LCAT) ou la lipoprotéine lipase (LPL)

Dans ce mémoire, nous aborderont les six principales lipoprotéines soit les chylomicrons, les résidus de chylomicrons « remnants », les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL).

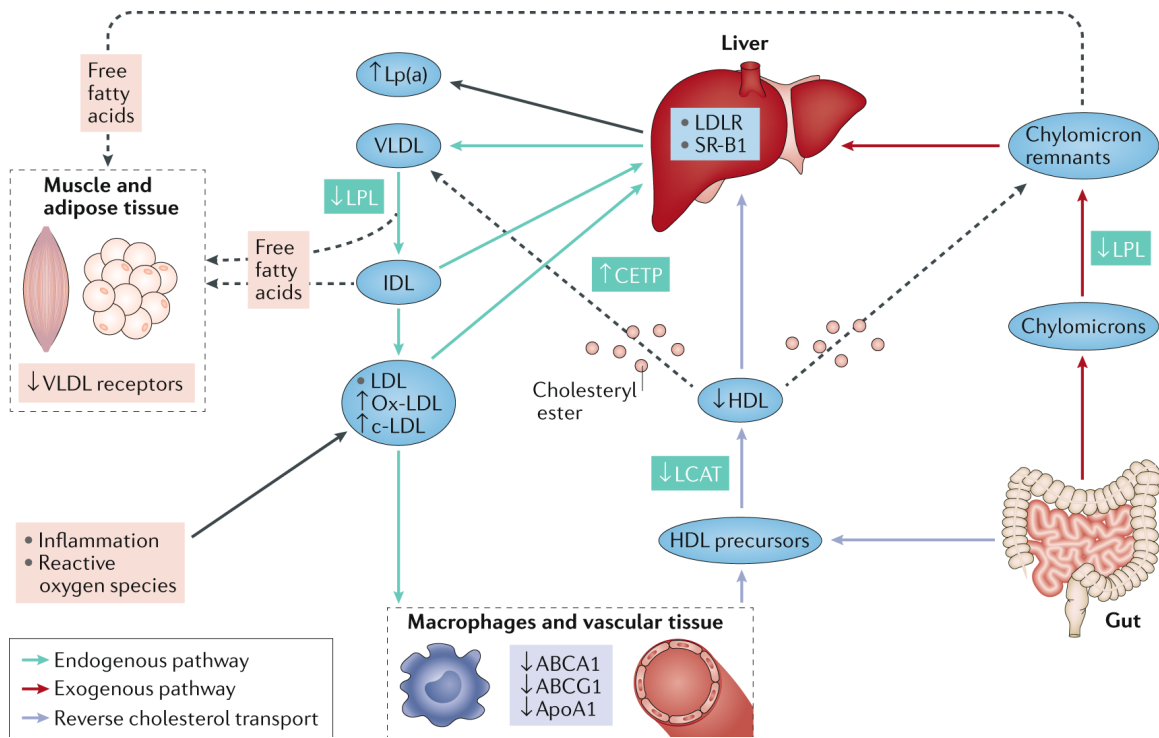
En ce qui concerne la lipoprotéine (a) (Lp(a)), celle-ci est une lipoprotéine particulière, car elle est formée d'une particule de LDL dont l'apB100 est attachée à l'apo(a) à l'aide un pont disulfure. Le rôle physiologique de cette lipoprotéine reste encore peu connu, mais un niveau élevé de cette lipoprotéine accélère la formation de plaques d'athérosclérose (3).

Tableau 1 : Taille et composition des lipoprotéines en apolipoprotéines (3)

Nom	Taille (nm)	Apolipoprotéines
Chylomicrons	75-1200	ApoB48, ApoCII, ApoCIII, ApoE et ApoAI, AII, AV
Résidus de Chylomicrons « remnants »	30-80	ApoB48 et ApoE
VLDL	30-80	ApoB100, ApoE et ApoC
IDL	25-35	ApoB100, ApoE et ApoC
LDL	18-25	ApoB100
HDL	5-12	ApoA-I, ApoA-II, ApoC et ApoE
Lp(a)	30	ApoB100, Apo(a)

1.1.2 Métabolisme du cholestérol

Le métabolisme du cholestérol implique 3 voies. Il y a la voie exogène qui permet l'absorption du cholestérol provenant d'une diète riche en lipides. Ensuite, il y a la voie endogène qui est caractérisée par la synthèse *de novo* du cholestérol. Ces deux voies vont permettre le transport des lipides provenant de l'alimentation et du foie aux cellules périphériques. La dernière voie est le transport inverse qui permet de maintenir l'homéostasie du cholestérol. Le transport inverse récupère l'excès de cholestérol des cellules périphériques et le dirige vers le foie pour être recyclé sous forme d'acides biliaires ou éliminé dans la bile (3).



*Autorisation de publication accordée par Springer Nature (8)

Figure 3 : Le métabolisme du cholestérol et son transport

- 1- Voie exogène : Le cholestérol provenant d'une diète riche en lipides est transporté à l'aide des chylomicrons circulant dans la lymphe avant d'atteindre la circulation sanguine. Les chylomicrons sont hydrolysés par la LPL permettant la libération des acides gras libres qui seront internalisés dans les cellules périphériques tel que les adipocytes et les cellules musculaires. Les chylomicrons hydrolysés deviennent alors des résidus de chylomicrons (*remnants*) qui seront captés par les LDLR hépatiques et seront retirés de la circulation (8).
- 2- Voie endogène : Le cholestérol synthétisé dans les hépatocytes est transporté dans la circulation sanguine par les VLDL. Les VLDL qui contiennent des triglycérides, des acides gras, du cholestérol et des phospholipides, seront catabolisés via les LPL en IDL et LDL qui seront internalisés via les LDLR dans les cellules qui en ont besoin (8).
- 3- Transport inverse du cholestérol (RCT) : Lorsqu'il y a un excès de cholestérol dans les tissus périphériques, les HDL captent le cholestérol et retournent vers le foie. Les HDL interagissent avec le *scavenger receptor class B type 1* (SR-B1). Cette liaison permet le transfert du cholestérol estérifié vers le foie où il sera excrété dans la bile (8).

ABCA1: ATP-binding cassette A1, ABCG1: ATP-binding cassette G1, ApoAI : Apolipoprotéine AI, CETP : cholesteryl ester transfer protein, c-LDL : LDL cholestérol, HDL : Lipoprotéine de haute densité, IDL: Lipoprotéine de densité intermédiaire, LCAT: Lecithin-Cholesterol Acyltransferase, LDL: Lipoprotéine de basse densité, LDLR : récepteur des LDL, Lp(a) : lipoprotéine (a), LPL: Lipase de lipoprotéine, ox-LDL : oxidized LDL, RCT : Transport inverse du cholestérol, SR-B1: scavenger receptor B1, TG: Triglycérides, VLDL: Lipoprotéine de très basse densité

1.1.2.1 Voie Exogène

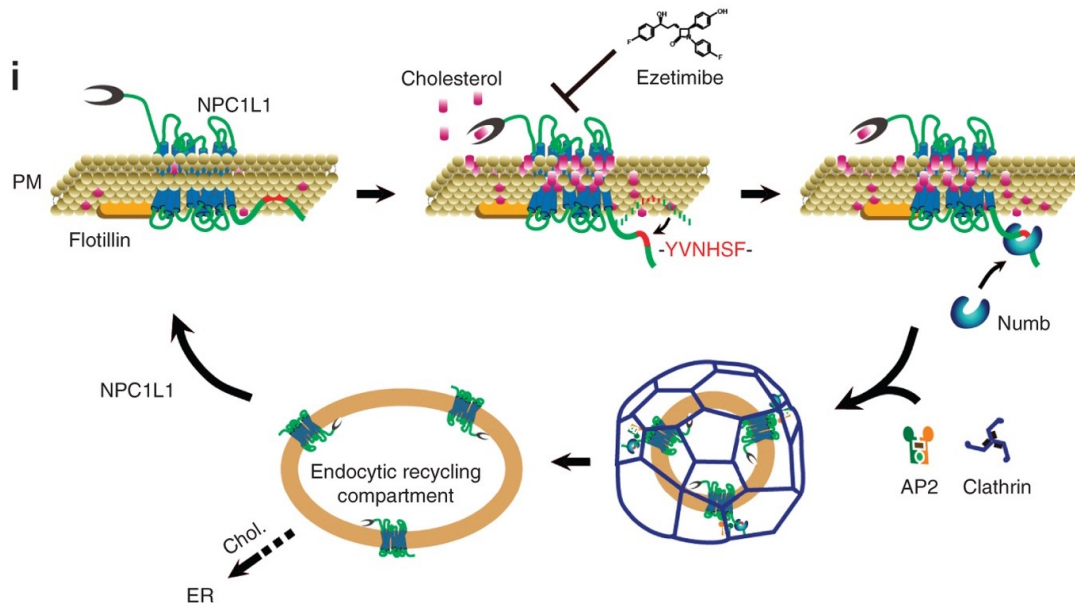
1.1.2.1.1 Digestion et absorption

Dans la voie exogène, le cholestérol est obtenu lors de la digestion des aliments contenant des lipides. Dans l'intestin, le cholestérol, les triglycérides (TG) et les phospholipides vont subir une émulsification par les sels biliaires (4). Les TG sont hydrolysés par la lipase pancréatique dans le duodénum, les phospholipides sont hydrolysés par la phospholipase pancréatique A2 dans le suc pancréatique et les esters de cholestérol sont hydrolysés par la cholestérol estérase (4, 9). L'hydrolyse des TG permet la libération des acides gras libres et du 2-monoglycéride. Les phospholipides sont hydrolysés en acides gras libres et en lysophospholipides. Finalement, l'hydrolyse des esters de cholestérol produit des acides gras libres et du cholestérol libre (4). Par la suite, les acides gras libres à courte chaîne diffusent à travers la membrane des entérocytes par un mécanisme appelé « Flip-Flop » (10). Les acides gras libre à longue chaîne entrent par des transporteurs membranaires tel que *fatty acid transport proteins* (FATP) plus particulièrement FATP4 (10).

Quant au cholestérol, il se lie à la protéine *Niemann-Pick C1 like-1* (NPC1L1) présente à la surface apicale des entérocytes (11). La protéine est un récepteur spécifique du cholestérol et permet son internalisation (11). Pour éviter l'absorption excessive du cholestérol provenant de la diète, l'excès de cholestérol retourne vers la lumière de l'intestin pour être sécrété dans la bile via l'action des protéines *ATP-binding cassettes* (ABC) soit ABCG5 et ABCG8 qui permettent son efflux (3). Lorsque le cholestérol libre interagit avec NPC1L1, NPC1L1 se lie à Numb, une protéine intracellulaire adaptatrice. Le complexe NPC1L1-Numb est internalisé dans les endosomes tapissés de clathrines (12). Après l'internalisation, le cholestérol est libéré des endosomes grâce aux transporteurs *Niemann-Pick type C1/C2* (NPC1/NPC2) (13) et est transporté au réticulum endoplasmique (RE) de l'entérocyte (9) (Figure 4).

Le cholestérol libre est estérifié par des acyl-COA : cholestérol acyltransférase (ACAT) et les acides gras et le 2-monoglycérides sont synthétisés en diacylglycérol. Le

diacylglycérol est estérifié avec un troisième acide gras via l'action de la diglycérade acyltransférase ce qui résulte en la formation de triacylglycérol (9). Ceux-ci entreront dans la composition des chylomicrons.



*Autorisation de publication accordée par Springer Nature (15)

Figure 4 : Transport du cholestérol jusqu'au réticulum endoplasmique

L'interaction du cholestérol libre avec NPC1L1 permet à NPC1L1 de se lier avec Numb. Le complexe de cholestérol-NPC1L1-Numb est internalisé dans des endosomes tapissés de clathrines. Le cholestérol est ensuite libéré des endosomes via les transporteurs NPC1/NPC2 et est transporté au réticulum endoplasmique (15).

AP2 : AP2 adaptor complex, ER : Réticulum endoplasmique, NPC1L1 : Niemann-Pick C1 like-1

1.1.2.1.2 Chylomicrons

Les chylomicrons sont des lipoprotéines dont le cœur est formé principalement de TG et d'esters de cholestérol (15). La composante protéique structurale majeure des chylomicrons est l'apolipoprotéine B48 (apoB48). Cependant, il y a aussi d'autres protéines à leurs surfaces telles que l'apolipoprotéine AI (apoAI), AII, AIII, AV, apoCII, CIII et apoE (14). Les chylomicrons sont exclusivement synthétisés dans la muqueuse intestinale en deux étapes (14). Dans la première étape, le chylomicron primordial est formé de l'apoB48, de phospholipides, de cholestérol et possède un contenu faible en TG et en esters de cholestérol (3,14). Dans la deuxième étape, il y a un enrichissement en TG

et en esters de cholestérol. Ces deux étapes se produisent dans le RE. L'apoB48 naissante commence alors à intégrer les lipides grâce à la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) (14,15). Les préchylomicrons sont ensuite transportés jusqu'à l'appareil de Golgi où l'apoAI s'associe aux préchylomicrons (14) et où il y a des modifications de la glycosylation de l'apoB48 (16). Les chylomicrons matures sont sécrétés dans la lymphe (17) et transportés vers la circulation sanguine (18). Dans le plasma, l'apoCII qui se trouve sur les chylomicrons interagit avec les lipoprotéines lipases, ce qui permet l'hydrolyse des TG en acides gras libres (19). Les acides gras sont absorbés par les adipocytes et les cellules musculaires grâce au récepteur *cluster of differentiation 36* (CD36) (3). À la suite de l'hydrolyse des TG, il y a une réduction de la taille des chylomicrons et la formation des résidus ou « *remnants* » de chylomicrons enrichis en esters de cholestérol qui circulent dans le plasma (3). L'apolipoprotéine E (ApoE) s'associe aux résidus de chylomicrons et permet aux particules de se lier aux récepteurs des LDL (LDLR) ou avec les *LDLR related proteins* (LRP) afin d'être captés par le foie (Figure 3) (3). Une fois internalisés dans les hépatocytes, les résidus vont être livrés aux lysosomes. Les esters de cholestérol sont hydrolysés par l'action de l'hydrolase d'ester de cholestérol et ceci va libérer des acides gras libres et du cholestérol (20). Le cholestérol pourra être utilisé dans la synthèse des VLDL ou gardé en réserve dans les gouttelettes lipidiques.

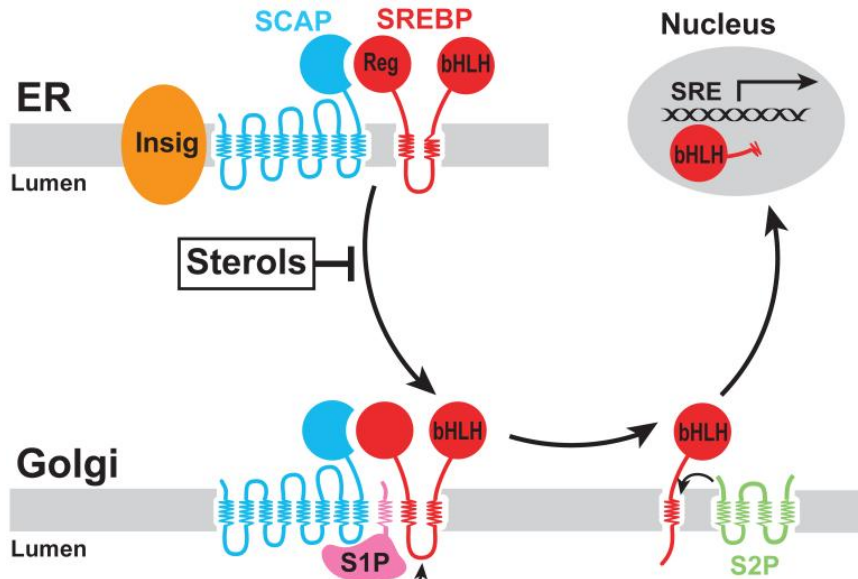
1.1.2.2 Voie endogène

La voie endogène est la voie que le cholestérol emprunte à partir de la synthèse *de novo* dans le foie jusqu'à l'atteinte des organes périphériques (Figure 3). Le foie joue un rôle crucial dans le maintien du taux de cholestérol puisqu'il permet la régulation des niveaux de lipoprotéines de basse densité riches en cholestérol (LDL-C) dans le plasma (5). Dans les hépatocytes, le cholestérol est intégré dans les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) pour être sécrété et transporté vers les organes périphériques (5).

1.1.2.2.1 Synthèse du cholestérol

Lorsque le niveau de cholestérol hépatique est faible, les hépatocytes augmentent la production de cholestérol grâce à une augmentation de l'expression et de l'activité des

21 enzymes nécessaires à la synthèse du cholestérol telle que la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) (21, 22). De plus, un faible niveau de cholestérol hépatique stimule l'internalisation de LDL-C plasmatique en augmentant l'expression du récepteur des LDL (LDLR). La régulation transcriptionnelle des enzymes de synthèse du cholestérol et du LDLR est très importante dans l'homéostasie du cholestérol et cette régulation est sous le contrôle de *sterol regulatory element-binding protein 2* (SREBP2). SREBP2 possède un mécanisme d'activation particulier et bien documenté. En effet, lorsqu'il y a suffisamment de cholestérol dans la cellule, la protéine *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP) lie le cholestérol via son domaine senseur de cholestérol. Ceci modifie la conformation de SCAP, lui permettant de lier à la fois *Insulin induced gene protein* (INSIG) et SREBP2. INSIG permet de garder le complexe SCAP-SREBP2 dans la membrane du RE (23). Lorsqu'il y a une diminution des niveaux de cholestérol dans les hépatocytes, il y a une diminution de la liaison du stérol à SCAP provoquant un changement de conformation et un détachement de INSIG (23). SCAP peut alors transporter SREBP2 du RE jusqu'à l'appareil de Golgi. Par la suite, SREBP2 est clivé par deux protéases, *Site-1 protease* (S1P/SKI-1) et *Site-2 protease* (S2P), et le domaine bHLH-Zip de SREBP2 est relâché de la membrane de l'appareil de Golgi. Le domaine bHLH-Zip migre vers le noyau où il se lie au *sterol response element* (SRE) dans la région promotrice de certains gènes tels que celui de HMG-CoA réductase et de LDLR (Figure 5). Cette liaison du domaine bHLH-Zip avec les gènes active leur transcription (23, 24).



*Autorisation de publication accordée par Springer Nature (23)

Figure 5 : Voie de signalisation de SCAP-SREBP dans la synthèse du cholestérol

Lorsque SCAP détecte une diminution des niveaux de stérols dans les cellules, il va permettre l'export des SREBPs du RE jusqu'à l'appareil de Golgi où deux protéases (S1P/SKI-1 et S2P) vont cliver SREBP. Le domaine bHLH-zip des SREBP est relâché de la membrane de l'appareil de Golgi et se dirige vers le noyau cellulaire où il lie le *sterol response element* (SRE) dans la région promotrice de certains gènes comme ceux de la HMG-CoA réductase et de LDLR et active leur transcription (23,24).

1.1.2.2.2 VLDL

1.1.2.2.2.1 Assemblage des VLDL

Les VLDL sont des lipoprotéines riches en TG qui transportent le cholestérol du foie jusqu'aux tissus en périphérie (25). Les acides gras utilisés pour former les TG incorporés dans les VLDL proviennent des adipocytes, des résidus des chylomicrons ou de l'intestin via la veine porte (25). La formation des VLDL est similaire à celle des chylomicrons, mais contrairement aux chylomicrons produits dans l'intestin, c'est l'apoB100 et non l'apoB48 qui est essentielle à l'assemblage des VLDL dans le foie. Au départ, dans le RE pendant la traduction et la translocation de l'apoB100, la MTP procède à la lipidation de l'apoB100 naissante par transfert de TG (26). Dans la lumière du RE, ces particules précurseurs vont fusionner avec les gouttelettes lipidiques pour obtenir d'autres TG (50-60%), du cholestérol (10-12%), des esters de cholestérol (4-6%) et des phospholipides (18-20%) pour former des VLDL matures (3, 26). Une fois en circulation, les VLDL matures peuvent acquérir d'autres apolipoprotéines telles que l'ApoCI et

l'ApoC4. Lorsqu'il n'y a pas une quantité suffisante de lipides, il y a une dégradation intracellulaire de l'apoB100 (26).

1.1.2.2.2 Catabolisme des VLDL

Les TG qui se trouvent dans les VLDL sont hydrolysés grâce à l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) activée par ApoCII se trouvant à la surface des VLDL. Cette hydrolyse se produit à la surface de l'endothélium vasculaire (27). L'hydrolyse des TG produit des acides gras et du glycérol qui seront utilisés par les cellules. Les VLDL perdent alors leurs TG et deviennent des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) (25).

L'apoE est une apolipoprotéine se trouvant sur les IDL et qui se lie aux récepteurs des LDL et LRP (25). Cette liaison permet de retirer de la circulation les IDL. Cette voie est analogue à la voie d'élimination des résidus des chylomicrons (25). Cependant, seulement la moitié de IDL sont retirés de la circulation. Les IDL encore en circulation sont catabolisés en LDL via l'hydrolyse des TG par la lipase hépatique et LPL et l'échange d'apolipoprotéines entre les IDL et les lipoprotéines de haute densité (HDL) (25) (Figure 3).

1.1.2.2.3 LDL

Les LDL sont majoritairement constitués d'esters de cholestérol et d'une molécule d'apoB100. Ils sont les principaux transporteurs de cholestérol vers les tissus périphériques. Les LDL lient leur récepteur LDLR se trouvant sur toutes les cellules de l'organisme (28). Cette liaison est due à l'épitope de l'apoB100 se trouvant à la surface des particules de LDL (28). Le motif NPXY situé sur la partie C-terminale cytoplasmique du LDLR (Figure 6) est reconnu par la protéine adaptatrice 1 des LDLR (LDLRAP1). Ceci permet l'internalisation dépendante de la clathrine du complexe LDL-LDLR dans les endosomes (29). La diminution du pH dans les endosomes provoque un changement de conformation du récepteur, ce qui favorise la dissociation du complexe LDL-LDLR et le recyclage du récepteur à la membrane. Ce recyclage permet d'amorcer un nouveau cycle d'internalisation des LDL (30). Les particules de LDL restent dans les lysosomes où les

esters de cholestérol et les TG sont hydrolysés par la lipase lysosomale appelée *lysosomal acid lipase* (LAL) (32). Cette hydrolyse permet de libérer le cholestérol et les acides gras libres (31,32) (Figure 7). Le cholestérol est transféré des lysosomes jusqu'au cytoplasme grâce aux protéines membranaires NPC1/NPC2 (13).

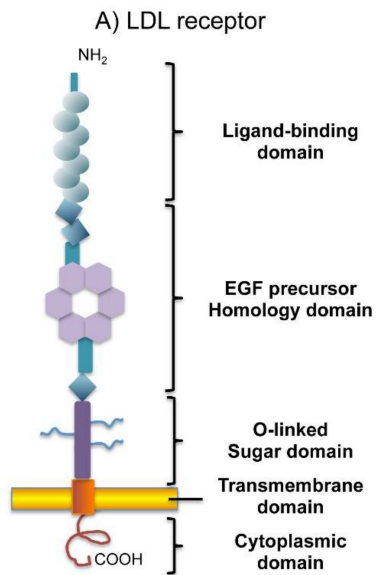


Figure 6 : Structure du récepteur des lipoprotéines de basse densité

Schéma représentatif du récepteur de LDL (LDLR). LDLR est une protéine transmembranaire formée de 839 acides aminés et organisée en 5 domaines distincts (33).

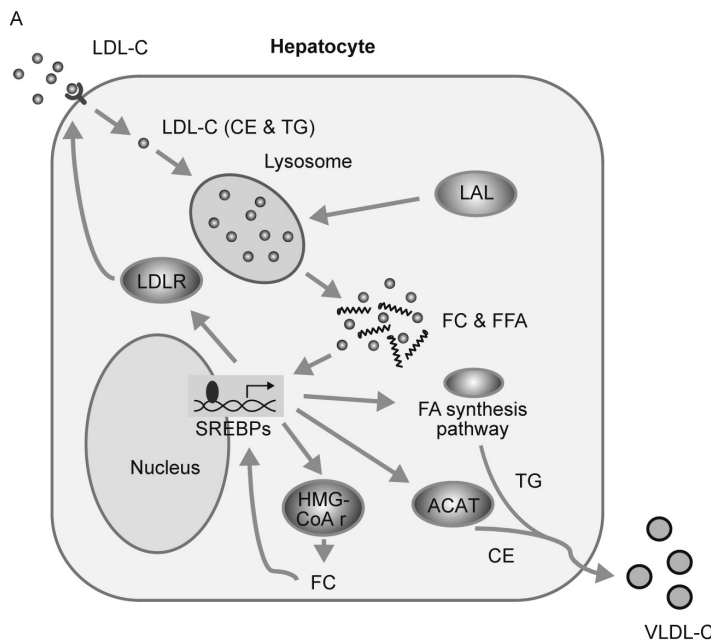


Figure 7 : L'internalisation du complexe LDL-LDLR

Le LDL-C se lie à son récepteur (LDLR) et le complexe est internalisé dans des endosomes recouverts de clathrines. À pH acide, le complexe se dissocie et LDL-C reste dans les lysosomes alors que LDLR est recyclé à la membrane. Grâce à l'action des lipases lysosomales, les esters de cholestérol et les triglycérides sont hydrolysés et le cholestérol libre et les acides gras libres sont libérés (32).

ACAT : Acyl-CoA cholesterol acyltransferase, CE: esters de cholestérol, FA: acides gras (fatty acids)
 FC: Cholestérol libre , FFA:Acides gras libres , HMG-CoA r: HMG-CoA reductase, LAL: lysosomal acid lipase, LDL-C : cholestérol de lipoprotéine de basse densité , LDLR: Récepteurs de LDL, SREBP: Sterol regulatory element-binding protein, TG : triglycérides, VLDL-C: Cholestérol de lipoprotéine de très basse densité.

1.1.2.3 Transport inverse du cholestérol

Le transport inverse du cholestérol (RCT) est un mécanisme qui permet d'excréter l'excédent de cholestérol qui s'accumule dans les tissus périphériques. Le cholestérol se dirige des tissus périphériques vers le foie et ce dernier élimine ou recycle le cholestérol (34) (Figure 3).

1.1.2.3.1 HDL et clairance du cholestérol

La formation des particules naissantes de HDL est amorcée avec la synthèse de l'apoA-1 dans le foie et dans l'intestin (3). L'apoA-I qui est prélipidée (pre- β HDL), interagit avec l'*ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) (35) présent sur les cellules des tissus périphériques et qui est responsable de l'efflux du cholestérol libre et des phospholipides. Ceci provoque la lipodation de pre- β HDL qui va alors adopter une forme discoïde lui permettant de devenir une particule de HDL naissante (35). Par la suite, la *lecithin-cholesterol acyltransferase* (LCAT) qui est activée par apoA-I (27) catalyse l'estérification du cholestérol libre. Les HDL matures sont alors formés et ont une forme sphérique (36). La particule de HDL mature contient dans son cœur majoritairement du cholestérol estérifié.

Pendant le transport inverse du cholestérol, la particule de HDL complètement lipidée sera transportée dans le sang jusqu'au foie. Le *Scavenger Receptor B1* (SR-B1) qui est exprimé sur les hépatocytes interagit avec la particule de HDL. Cette interaction permet la capture sélective du cholestérol (37). Lorsque le cholestérol se retrouve dans le foie, ce dernier participe à la synthèse des sels biliaires ou il est excrété du foie dans la bile (38) (Figure 4).

1.2 Maladies impliquant la dyslipidémie

Le métabolisme des lipides est très bien régulé. Cependant lorsqu'il y a une augmentation des niveaux de LDL et VLDL ou une diminution de HDL, cela cause une dyslipidémie. Par exemple une augmentation des niveaux de LDL cause

l'hypercholestérolémie. Certaines maladies contribuent à une dyslipidémie tel que l'obésité et d'autres tel que l'athérosclérose découlent d'une dyslipidémie (41, 67).

1.2.1 Obésité, dyslipidémie et maladies cardiovasculaires

1.2.1.1 Obésité

L'obésité est une maladie qui est caractérisée par une accumulation de gras jugée excessive (39). Les patients ont un indice de masse corporelle qui est égal ou plus grand à 30 kg/m^2 (40). Le risque de développer une maladie cardiovasculaire (MCV) est important chez les patients souffrant d'obésité. En effet, l'obésité est une cause du diabète mellitus, de l'hypertension et de la dyslipidémie qui sont des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires tel que l'athérosclérose (41). La dyslipidémie présente chez les patients ayant de l'obésité est caractérisée par une augmentation de LDL-C et une augmentation d'apoB dans le plasma (41). De plus, chez les personnes souffrant d'obésité, la sécrétion d'acide gras libres à partir du tissu adipeux blanc est augmentée (42).

Chez les enfants âgés de 4 à 10 ans qui sont hypercholestérolémiques, la masse de gras corporelle est accrue par rapport aux enfants sains (43). En effet, chez les personnes hypercholestérolémiques, il peut y avoir une dysfonction dans la sécrétion d'adipocytokines avec une augmentation des niveaux de leptine et de visfatine dans le plasma (44,45).

1.2.1.2 Adipocytes, adipocytokines et les maladies cardiovasculaires

Les adipocytes sont les cellules qui forment le tissu adipeux. Le tissu adipeux est un organe impliqué dans la régulation endocrine de l'organisme via la sécrétion des adipocytokines (42, 46). Ces hormones peuvent avoir un apport positif ou négatif sur le système cardiovasculaire et influencer le développement de MCV. Les adipocytokines sont divisées en deux catégories, celles qui ont un effet protecteur et celles qui peuvent être potentiellement pathogéniques.

La leptine est probablement l'adipocytokine la plus connue avec l'étude de Zhang *et al.* qui montre que les souris obèses avec un génotype *ob/ob*, ont une déficience de la leptine (47, 48). La leptine est donc un facteur de satiété dont l'absence du gène ou la résistance à la leptine cause l'obésité (*ob*) (47). Une étude par Wallace *et al.* effectuée sur les patients de l'étude WOSCOPS (*West of Scotland Coronary Prevention Study*) a montré que chez les hommes qui ont eu un évènement cardiovasculaire, les niveaux de leptine dans le plasma sont significativement plus élevés avec $5,87 \pm 2,04$ ng/mL par rapport aux contrôles avec $5,04 \pm 2,09$ ng/mL (49). Les niveaux de leptine dans le plasma sont 16% plus élevés chez les patients ayant eu un évènement cardiovasculaire par rapport aux patients n'ayant pas eu un évènement cardiovasculaire (49). Cette augmentation du risque d'avoir un évènement cardiovasculaire lorsque les niveaux de leptine sont augmentés est associée à l'effet de la résistance à la leptine sur l'athérosclérose (50). En effet, chez les souris apoE^{-/-} traitées avec la leptine, les surfaces de lésions sont 2 fois plus importantes dans l'artère brachiocéphalique et 1,5 fois plus importantes dans les carotides par rapport aux souris apoE^{-/-} injectées avec le véhicule contrôle (50). De plus, l'épaisseur des lésions chez les souris apoE^{-/-} traitées avec la leptine est plus grande avec une augmentation de l'épaisseur moyenne de l'intima-média de 3,5 fois dans l'artère brachiocéphalique et 2,5 fois dans les carotides par rapport aux souris apoE^{-/-} injectées avec le véhicule contrôle (50). Bref, la résistance à la leptine ou de trop grande concentration de la leptine ont des effets pathogéniques pouvant mener au développement de l'athérosclérose.

Ensuite, la résistine est une adipokines qui induit la résistance à l'insuline. Les niveaux élevés de la résistine sont associés au développement de symptômes cardiovasculaires chez les patients souffrant de diabète mellitus (47). Il y a aussi la visfatine qui est une adipokine qui peut mimer l'insuline (226) et qui est élevée chez les patients avec de l'obésité et qui peut être utilisée comme un biomarqueur du développement de la plaque athérosclérotique. Une étude menée par Spiroglou *et al.* montre qu'il y a une association entre l'expression des adipocytokines dans le tissu adipeux péricardique et l'athérosclérose coronaire avec une corrélation positive pour la visfatine (51). La visfatine induit l'expression de l'ARN messager (ARNm) et l'expression protéique des molécules d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et des molécules d'adhésion aux cellules vasculaires

1 (VCAM-1) dans les cellules endothéliales (52) (section 1.2.2). *In vivo*, l'adipocytokine à 500 ng/mL induit aussi l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales (52). Dans l'aorte *ex vivo* de souris, le traitement avec la vistafine augmente le nombre de monocytes adhérents de 3 fois par rapport au contrôle qui est la saline (52). Bref, une augmentation de l'expression de la visfatine dans le tissu adipeux péricardique est associée au développement de l'athérosclérose (46).

Parmi les adipocytokines qui ont un effet protecteur, il y a l'adiponectine (section 1.3.2.1.3) et l'omentine, qui réduisent l'inflammation et le stress oxydatif et stimulent la production d'oxyde nitrique (NO). Finalement, il y a l'apeline dont le rôle dans le développement de MCV reste encore à élucider. Elle favorise le développement de l'athérosclérose *in vivo*, alors que dans les modèles *ex vivo*, elle a des propriétés vasodilatrices (46). En effet, l'apeline active la phosphorylation de protéine kinase B (Akt), ce qui augmente les niveaux de calcium intracellulaire. Cette augmentation du calcium active la phosphorylation de la synthase d'oxyde nitrique endothéliale (eNOS) et la relâche de l'oxyde nitrique. Ce qui cause une vasorelaxation des artères (53). De plus, l'apeline jouerait un rôle dans l'athérosclérose via l'action de son récepteur, APJ. En effet, chez les souris *APJ^{-/-} ApoE^{-/-}* sur une diète riche en cholestérol, il y a une réduction de 34% de la formation de lésions athérosclérotiques dans le sinus aortique après 15 semaines (54).

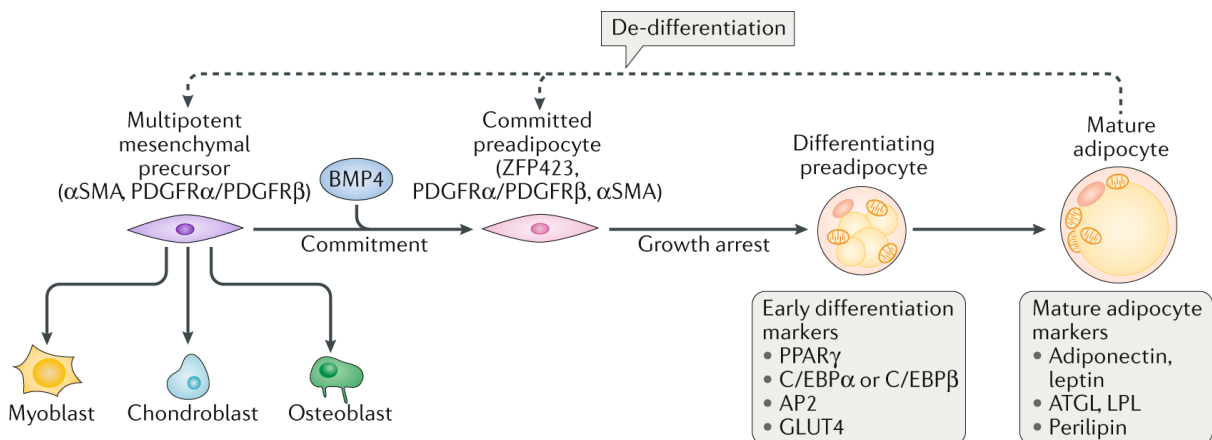
Plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont produites par le tissu adipeux. Ces cytokines incluent l'interleukine 6 (IL-6) et le *tumour necrosis factor alpha* (TNF- α) (55). TNF- α provoque une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine *Angiopoietin-like 4* (ANGPTL4). ANGPTL4 inhibe l'activité enzymatique de LPL via une liaison directe. Cette liaison convertit la forme dimère active de LPL en monomères inactifs (56). L'inactivation de LPL réduit la capture des triglycérides (TG) par le tissu adipeux et cause une hypertriglycéridémie (57).

Chez les animaux rendus obèses on observe une surexpression de TNF- α et d'IL-6 menant à un état pro-inflammatoire présent en tout temps (55). Cet état pro-inflammatoire peut contribuer au développement de maladies cardiovasculaires tel que l'athérosclérose

où les cytokines inflammatoires favorisent le recrutement de monocytes qui vont se différencier en macrophages (55). Ces macrophages vont alors internaliser les particules de LDL et se transformer en cellules spumeuses, ce qui favorise le début de la formation de la lésion tel que décrit dans la section 1.2.2 sur l'athérosclérose.

La dyslipidémie chez les personnes obèses est caractérisée par une hypercholestérolémie causée par une augmentation de LDL-C et une hypertriglycéridémie qui est causée par une augmentation des niveaux d'acides gras libres qui se dirigent vers le foie, ce qui mène à une augmentation des TG dans le foie (121). Dans l'obésité caractérisée par une adiposité viscérale (obésité morbide) cette augmentation des TG mène alors à une augmentation de la synthèse de VLDL (41). Les VLDL synthétisées vont entrer en compétition avec les chylomicrons pour l'hydrolyse par les LPL, car les deux lipoprotéines partagent le même métabolisme d'hydrolyse par LPL tel que décrit dans la section 1.1.2.2.2 (41, 157).

1.2.1.3 Adipogénèse



*Autorisation de publication accordée par Springer Nature (59)

Figure 8 : Adipogénèse : Différenciation des fibroblastes en cellules adipeuses

Les cellules précurseurs mésenchymateuses seront restreintes à se différencier en adipocytes grâce à la BMP4. Les préadipocytes vont avoir un arrêt de leur croissance causé par la liaison des BMPs à leur récepteur, ce qui active SMAD4 qui va à son tour permettre l'activation de PPAR γ et la transcription de C/EBP α et C/EBP β . Ceci induit l'adipogénèse (59).

AP2 : Activating protein 2, ATGL : Adipose triglyceride lipase, BMP4 : Bone morphogenetic protein 4, C/EBP α et C/EBP β : CCAAT/enhancer-binding protein alpha et beta, GLUT4 : Transporteur de glucose 4, LPL : Lipoprotéine lipase, PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ

L'adipogénèse est le processus par lequel les cellules précurseurs mésenchymateuses se différencient en cellules sensibles à l'insuline et chargées de lipides appelées adipocytes (58). Les cellules précurseurs mésenchymateuse subissent un processus qui s'appelle « *commitment* » où les cellules deviennent des préadipocytes (59). *Bone morphogenetic protein 2* (BMP2) et BMP4 lient alors leurs récepteurs pour activer SMAD4 qui à son tour stimule la transcription de *peroxisome proliferator-activated receptor-γ* (PPAR γ). PPAR γ_2 est l'isoforme le plus commun des récepteurs nucléaires hormonaux qui se trouvent dans les adipocytes (63). L'activation des PPAR γ promouvoit la différenciation des adipocytes (61, 62) en activant les gènes codant pour les protéines qui sont impliquées dans le stockage des lipides et dans le métabolisme des lipides telles qu'*adipocyte protein 2* (aP2) et CD36 (63). PPAR γ est exprimé à des bas niveaux dans les préadipocytes et son expression augmente tout au long de la différenciation (64). PPAR γ active alors le facteur de transcription *CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (C/EBP α) (59) et l'expression de C/EBP α augmente au cours de la différenciation (61). PPAR γ et C/EBP α induisent l'adipogénèse en activant différents gènes impliqués dans la formation d'adipocytes et l'accumulation de lipides dans ces cellules. Ces gènes incluent ceux de aP2 et CD36 pour PPAR γ et ceux de aP2 et phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) pour C/EBP α (65). PPAR γ et C/EBP α travaillent en synergie (62) pour activer les récepteurs à insuline et à l'adiponectine (59). Puisque PPAR γ et C/EBP α activent la transcription de gènes qui permettent le stockage des lipides dans les cellules préadipocytaires, l'accumulation de lipides va alors stimuler la transcription du transporteur de glucose 4 (GLUT4) (59). PPAR γ , C/EBP α et GLUT4 sont exprimés dans les adipocytes matures en plus d'autres marqueurs de la différenciation tel que LPL, la leptine, l'adiponectine et *adipose triglyceride lipase* (ATGL) (59) (Figure 8).

Une autre protéine dont l'expression augmente au cours de la différenciation est CD36. CD36 est une glycoprotéine membranaire qui joue un rôle dans le métabolisme des lipides, l'athérosclérose et l'immunité (66). La protéine se trouve dans les adipocytes où elle lie et facilite le transport des acides gras à longue chaîne dans la cellule (66).

1.2.2 Athérosclérose

L'obésité et la dyslipidémie augmentent le risque d'infarctus du myocarde en accélérant le développement de l'athérosclérose. L'athérosclérose est caractérisée par une accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans les vaisseaux de moyens et grands calibres dont la paroi est formée de collagène de type I et de type II, de macrophages et des cellules de muscles lisses (67).

1.2.2.1 Dysfonction endothéliale

Les cellules endothéliales sont localisées dans la paroi interne des vaisseaux sanguins et séparent les cellules sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes) des cellules musculaires lisses. Les fonctions principales de l'endothélium sont de maintenir et de réguler la fonction vasculaire en réponse aux hormones, neurotransmetteurs et aux facteurs vasoactifs qui affectent le tonus, la surface antithrombotique, l'agrégation des plaquettes et l'inflammation (69). Une balance entre la vasoconstriction et la vasodilatation est possible grâce aux substances vasodilatatrices tel que l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline et aux substances vasoconstrictrices tel que l'endotheline et l'angiotensine II (69). Dans l'athérosclérose, une diminution de la production ou de l'activité du NO cause une dysfonction dans la vasodilatation et cette dysfonction est un des premiers facteurs contribuant au développement de l'athérosclérose (70).

Lorsqu'il y a une augmentation des forces de cisaillement due au flux sanguin sur les cellules endothéliales, l'expression et l'activité de la synthase d'oxyde nitrique endothéliale (eNOS) augmentent (71). L'enzyme eNOS permet la synthèse du NO en deux étapes (72). Dans la première étape, c'est l'hydroxylation par eNOS de L-arginine en N^o-hydroxy-L-arginine. Par la suite, c'est l'oxydation du N^o-hydroxy-L-arginine en L-citrulline et NO (72). Le NO est une molécule gazeuse qui se lie à l'hème prosthétique de la guanylate cyclase (GC) soluble, ce qui cause l'activation de l'enzyme GC. L'activation de la GC soluble augmente la conversion de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (73). Ceci conduit à la vasorelaxation des vaisseaux

sanguins, à la diminution de l'adhérence et de l'agrégation des plaquettes, à la diminution de l'adhésion et de l'infiltration des leucocytes et à la diminution de la prolifération des cellules vasculaires du muscle lisse (VSMC) (70).

La dysfonction endothéliale est caractérisée par une diminution des molécules vasodilatatrices tel que le NO. La diminution de la production de NO peut être causée par la diminution de la production ou de l'activité de eNOS. En effet, le LDL-C augmente la synthèse de caveolin-1 qui inhibe eNOS, ce qui inhibe la production de NO (70). Le deuxième mécanisme de diminution du NO implique les dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species* ou ROS) (74). En effet, lorsque l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite (NADPH) augmente, cela génère une augmentation de l'anion superoxyde. L'anion superoxyde réagit avec le NO, ce qui produit l'ion peroxyde (OONO⁻) et inactive le NO (74). L'inactivation et la diminution de la production de NO résultent en l'augmentation de l'agrégation plaquettaire, de la prolifération et de la migration du VSMC et de l'adhésion des leucocytes (70).

1.2.2.2 Formation de la plaque d'athérosclérose

Les particules de LDL-C circulantes peuvent traverser l'endothélium des artères par transcytose grâce au récepteur SR-B1 (67,75,76). Lorsqu'elles atteignent l'intima, les particules de LDL peuvent être retenues dans la matrice extracellulaire via l'interaction de certains résidus d'arginine et de lysine qui composent l'apoB100 et qui sont chargés positivement avec les groupes sulfates des protéoglycanes sous-endothéliales qui sont chargés négativement (77). Les particules de LDL sont par la suite oxydées dans l'intima par des enzymes telles que les lipoxygénases (67). Cette oxydation et l'accumulation de LDL oxydé déclenche l'expression des molécules d'adhésion tel que les ICAM-1 (78), VCAM-1, E-sélectine et P-sélectine à la surface des cellules endothéliales et des macrophages (67,79). Les cellules endothéliales changent de forme, ce qui favorise la migration des leucocytes. Les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires incluant l'interféron gamma (IFN- γ) qui augmentent les niveaux de *scavenger receptor-A* (SR-A) à la surface des macrophages. Ceci provoque une augmentation de l'endocytose de

LDL oxydés, de la sécrétion du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et d'interleukines (IL) tel qu'IL-6 (67,79,80).

Lors de la dysfonction endothéliale, les monocytes sont recrutés puis adhèrent à la surface de l'endothélium par un mécanisme de roulement des leucocytes. L'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales fait d'abord intervenir E-sélectine sur l'endothélium, L-sélectine sur les leucocytes et P-sélectine sur les plaquettes (78,79). Ces différentes sélectines vont se lier à des formes sialylées d'oligosaccharides via leur domaine lectine (67,78,79). Il y a alors des médiateurs qui activent les cellules endothéliales en augmentant l'expression des sélectines. Ceci résulte en une adhésion qui est brève et faible qui permet le roulement des leucocytes à la surface endothéliale, mais qui ne permet pas le passage trans-endothélial (78,79). L'arrêt des leucocytes et l'adhésion solide grâce à un système adhésif inter-cellulaire est médié par une interaction entre les molécules d'adhérence endothéliales tel que ICAM-1 et VCAM-1 et les intégrines. Les intégrines sont présentes sur les leucocytes activés par des cytokines telles que *Lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) et *very late antigen-4* (VLA-4). Finalement, d'autres molécules d'adhésion telle que *cluster of differentiation 31* (CD31) vont permettre la migration cellulaire à la surface de la matrice extracellulaire lors de la phase de passage trans-endothéliale (78,79).

Le recrutement des monocytes est médié par les chimiokines (CCL2, CCL5, CXCL4-CCL5) et les cytokines telles que *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1) qui sont sécrétées par les cellules endothéliales (81, 82). Lorsqu'ils sont dans l'intima, les monocytes se différencient en macrophages sous l'action des facteurs de croissance tel que le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) et le facteur stimulant les colonies de macrophages (M-CSF) (83). Les macrophages expriment alors des récepteurs éboueurs comme *Scavenger receptor class A-I* (SR-A1) ou A-II (SR-AII), CD36, *Oxidized low-density lipoprotein receptor 1/ lectin-type oxidized LDL receptor 1* (LOX-1) ou CXCL16 (84). Ces récepteurs éboueur permettent l'internalisation des particules de LDL-C dans les macrophages (84). L'accumulation du cholestérol transforme les macrophages en cellules spumeuses (83). La migration des leucocytes dans l'intima,

leur différenciation en macrophages et l'accumulation des cellules spumeuses entament la formation du cœur lipidique de la lésion athérosclérotique (86). Lorsque les cellules spumeuses entrent en apoptose, les lipides retenus en leur cœur sont libérés. Ces lipides intègrent alors le cœur lipidique nécrotique de la plaque (87).

Les macrophages sécrètent des facteurs de croissance comme le *platelet-derived growth factor* (PDGF) et des cytokines comme MCP-1 et TNF- α qui induisent la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) de la média vers l'intima (88). Les VSMC sécrètent de l'élastine et du collagène qui causent l'épaississement de la lésion (84,88). Les VSMC ainsi activées produisent des éléments fibreux qui augmentent la densité de la matrice extracellulaire qui est composée de collagène, d'élastine et de protéoglycanes (88). Les éléments fibreux sécrétés par les VSMC recouvrent le cœur lipidique de la plaque, ce recouvrement est nommé la chape fibreuse (88). Les éléments fibreux augmentent en taille et commencent à réduire le diamètre des vaisseaux sanguins (75).

Les plaquettes sont des médiateurs dans la formation de la plaque tôt dans le développement de l'athérosclérose en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (IL-1) et de chimiokines (CXCL4, CXCL7, CXCL1, CXCL5, CCL5 et CCL3) qui vont promouvoir la migration de monocytes (84,89). En l'absence de pathologie, la P-sélectine est exprimée dans les granules alpha des plaquettes. Lorsque activées, les plaquettes expriment P-sélectine à leurs surfaces. La P-sélectine se lie à *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL1) qui se trouve à la surface des cellules endothéliales (78, 85). Cette liaison permet le roulement des plaquettes sur l'endothélium des artères, l'activation et le recrutement des monocytes (78,85).

1.2.2.3 Formation d'un thrombus

Le principal danger de l'athérosclérose est la formation de thrombus causée par la rupture de la plaque (84). Les plaques qui subissent une rupture possèdent des caractéristiques spécifiques : Une chape fibreuse mince, une augmentation de l'inflammation dans la chape fibreuse, une diminution des niveaux de collagène et de la

quantité de VSMC dans la plaque, une néo-vascularisation et un large cœur lipidique et nécrotique (84). Les cellules pro-inflammatoires comme les macrophages vont produire les métalloprotéases matricielles (MMP) (MMP-9, MMP-2, MMP-8, MMP-13) qui vont dégrader la matrice extracellulaire formée par les VSMC. Cette dégradation peut provoquer la rupture partielle ou complète de la plaque (88, 90). Lorsque la plaque entre en contact avec le sang, les plaquettes sont recrutées au site de lésion, ce qui engendre une série d'évènements,

- a. L'arrêt des plaquettes à l'intima exposée
- b. Recrutement et activation d'autres plaquettes via la sécrétion d'agonistes plaquettaires tel que la thrombine
- c. Stabilisation de l'agrégation plaquettaire

Cette série d'évènements provoque la formation d'un thrombus dont la libération peut obstruer un vaisseau sanguin (84).

1.2.2.4 Traitements

Pour prévenir le développement de l'athérosclérose, la dyslipidémie est traitée à l'aide d'une modification du mode de vie ou de différents médicaments.

1.2.2.4.1 Traitements non-médicamenteux

1.2.2.4.1.1 Diète et exercices

Pour les patients ayant une dyslipidémie, un traitement jumelant une diète faible en gras saturé et de l'exercice diminue les niveaux de LDL-C en permettant l'hydrolyse des triglycérides en acides gras (91). En effet, dans une étude menée par Stefanick *et al.* les sujets étaient divisés selon le sexe en quatre groupes soit sur diète seulement, exercice seulement, diète jumelée avec de l'exercice et le groupe contrôle. Pour les sujets avec une diète seulement, il y a eu une réduction des niveaux de cholestérol total de 7,9% et des niveaux de LDL-C de 7,3 % chez les femmes (92). Chez les hommes, la diminution des niveaux de LDL-C était de 10,8%. Pour le deuxième groupe, il fallait faire de l'exercice aérobique trois fois par semaine pendant 60 minutes. La diminution des niveaux de LDL-

C était de 3,6% chez les hommes et de 5,6 % chez les femmes. Pour le troisième groupe, lorsque la diète était jumelée avec l'exercice, il y avait une diminution des niveaux de LDL-C de 14,5 % chez les femmes et de 20,0 % chez les hommes. (92). Une autre étude par WOO *et al.* effectuée sur des enfants de 9 à 12 ans souffrant d'obésité sur une diète ou une diète jumelée à de l'exercice a montré qu'il y a une diminution significative des niveaux de cholestérol dans les deux groupes après 6 semaines. Après 1 an, les enfants dans le groupe de la diète jumelée à l'exercice ont eu une amélioration la fonction endothéliale et une diminution de l'épaississement de la paroi de la carotide par rapport aux enfants dans le groupe avec une diète seulement (231).

1.2.2.4.1.2 Acides gras Omega-3

L'*American Heart Association* recommande de consommer 1g/jour d'omega-3 marin pour les patients souffrant de maladies cardiovasculaires (MCV) puisque la diète normale dans les pays de l'occident ne contient pas les niveaux nécessaires pour pouvoir avoir un effet sur les MCV (93). Dans une revue systématique de la littérature menée par l'équipe de Delgado-Lista *et al.*, les résultats combinés de 21 études cliniques sur les effets des acides gras oméga-3 montrent une diminution de 10% des événements cardiovasculaires chez les patients prenant l'oméga-3 par rapport au groupe contrôle (93). En ce qui concerne la mortalité due aux maladies cardiaques, il y avait une diminution de la fréquence de 9% (93). L'effet des oméga-3 serait dû à une diminution des niveaux des triglycérides. En effet, les oméga-3 inhibent la lipogenèse hépatique en inhibant l'action de SREBP-1C qui est un facteur transcriptionnel dont le rôle est de stimuler la synthèse d'enzyme qui permettent la lipogenèse. Leur effet est aussi le résultat de l'augmentation de l'oxydation des acides gras dans le foie (94). Une autre étude (REDUCE-IT) effectuée sur 4,9 ans avec un acide oméga-3 purifié nommé Icosapent éthyle (EPA) par Bhatt *et al.* a montré une réduction du risque de MCV. En effet, les patients recevant 2 g de EPA deux fois par jour avec une statine ont eu une réduction de 25% de la mort cardiovasculaire, l'infarctus du myocarde non-fatal, des accidents vasculaires cérébraux, de la revascularisation coronarienne et des angines instables par rapport au groupe avec le placebo et une statine (120).

1.2.2.4.2 Traitements médicamenteux

1.2.2.4.2.1 Statines

Les statines sont les médicaments de première ligne pour traiter l'hypercholestérolémie et donc les plus prescrits (95). Les statines inhibent la HMG-CoA réductase, l'enzyme limitante de la voie de synthèse du cholestérol (95). Les statines qui ont une structure semblable à l'HMG-CoA vont se lier à la HMG-CoA réductase et bloquer son site catalytique (68). Cette inhibition cause l'arrêt de la synthèse de cholestérol et induit l'activation de SREBP-2 qui va provoquer l'augmentation de l'expression de LDLR et augmenter la clairance de LDL ou d'IDL du plasma (95). En effet, ceci permet de diminuer les niveaux de LDL-C dans la circulation sanguine de 20 à 55% (68, 157).

1.2.2.4.2.2 Niacine

La niacine qui est aussi appelée vitamine B3 est le premier traitement qui réduit l'utilisation des acides gras libres qui proviennent des adipocytes (75). La niacine active son récepteur GPR109A sur les adipocytes. Cette activation induit l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) qui est médiée par G_i (famille des protéines G). Cette inhibition induit à son tour la diminution de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (97). Puisque l'AMPC est le médiateur intracellulaire du stimulus prolipolytique, la diminution de l'AMPC va alors induire la diminution de la lipolyse. Ceci réduit la relâche des acides gras libres des adipocytes. La diminution des acides gras libres en circulation diminue aussi leur utilisation par le foie pour la synthèse de lipoprotéines (97). Dans une étude menée par Maccubbin *et al.*, lorsque la niacine à libération prolongée était donnée aux patients ayant une dyslipidémie, il y avait une réduction de 18,4 % des niveaux de LDL-C avec une augmentation de 20,0% des niveaux de HDL-C par rapport au placebo (98). Cependant, la niacine possède beaucoup d'effets indésirables, ce qui rend son utilisation très rare. Parmi ces effets, il y a les bouffées de chaleur, les problèmes gastro-intestinaux (diarrhée et nausée) et la vasodilatation cutanée (*flushing*) associée à une démangeaison et un érythème (97).

1.2.2.4.2.3 Séquestrants des acides biliaires

Les séquestrants des acides biliaires sont des résines (polymères) qui lient les acides biliaires et forment des complexes insolubles (75). Ces complexes ne peuvent pas traverser la membrane des entérocytes, ce qui résulte en leur excrétion dans les fèces (75). Puisqu'il y a une diminution de la recirculation entéro-hépatique des acides biliaires, les niveaux de cholestérol synthétisé dans le foie sont diminués. Cette diminution provoque une augmentation de l'expression des LDLR. Puisque les LDLR sont plus exprimés, la concentration de LDL-C dans le plasma est diminuée à son tour (75). De plus, le foie utilise le cholestérol pour la néo-synthèse d'acides biliaires.

1.2.2.4.2.4 Inhibiteur de l'absorption du cholestérol : Ézétimibe

L'ézétimibe inhibe le transporteur de cholestérol NPC1L1 dans lumière de l'intestin à la surface des entérocytes et aussi à l'interface hépatobiliaire, ce qui diminue l'influx de cholestérol (Figure 4). Puisqu'il y a moins de cholestérol qui est absorbé, il y a moins de chylomicrons formés et moins de chylomicrons sécrétés. La diminution du cholestérol qui se rend au foie cause une activation de SREBP2 et une augmentation d'expression des LDLR hépatiques, ce qui permet une augmentation de la clairance des LDL-C du plasma (99). Il est important de noter que le médicament n'affecte pas l'absorption des TG et des vitamines hydrophobes (99). L'ézétimibe peut être prescrit avec les statines et causer une diminution plus importante des LDL-C soit de 10-15% plus grande que lorsque la statine est prescrite en monothérapie (158).

1.2.2.4.2.5 Inhibiteurs de PCSK9

Les inhibiteurs de proprotéine convertase subtilisine/kexine type 9 (PCSK9) tels que les anticorps monoclonaux anti-PCSK9 sont les seuls traitements présentement acceptés par Santé Canada lorsque jumelés avec un traitement aux doses maximales tolérées de statines (96). Les anti-PCSK9 sont présentement indiqués pour les patients ayant une hypercholestérolémie familiale hétérozygote ou homozygote et traités à dose maximales de statine et d'ézétimibe. Les anticorps ont une affinité contre le domaine

catalytique de PCSK9, ce qui bloque la liaison avec LDLR (100). Il est important de noter qu'à cause de l'augmentation du LDLR, les anticorps monoclonaux permettent aussi de diminuer les niveaux de l'apoB et les niveaux de cholestérol total non-HDL qui sont transportés par les lipoprotéines athérogènes (101). Les anticorps monoclonaux présentement sur le marché sont l'évolocumab (Repatha®) et alirocumab (Praluent®). L'étude FOURIER a démontré que la prise de l'évolocumab avec une statine réduit les niveaux de LDL-C de 59% en plus de l'effet de la statine, avec une réduction de 15% de la mortalité cardiovasculaire (102). L'étude ODYSSEY OUTCOME a montré que la prise de l'alirocumab avec une statine réduit le risque de mortalité cardiovasculaire de 15 % et de 25% chez les patients les plus à risque, soit ceux avec des niveaux de LDL-C plus élevés que 100 mg/dL (103).

En phase précoce de développement, il y a les petites molécules mimétiques du LDLR-EGF(A) qui empêchent la liaison du récepteur LDLR avec PCSK9 (101). Il y a aussi les Adnectines (des protéines thérapeutiques) qui vont se lier à PCSK9 et empêcher sa liaison avec LDLR (100). Il y a les vaccins qui peuvent être développés à partir de peptides ou des particules apparentées aux virus (VLP). Pour le vaccin, des bactériophages VLP ont des épitopes de PCSK9 à leur surface à proximité du site de liaison de LDLR (104). Le but du vaccin est d'activer les cellules B qui se dirigent alors contre PCSK9. Lorsque les souris et les macaques ont été injectés avec le vaccin, ceux-ci ont montré une réponse spécifique au peptide et des immunoglobulines G qui sont réactives à PCSK9 (104). Chez les macaques vaccinés, il y avait une réduction de 10-15% des niveaux de LDL-C. Ces vaccins sont avantageux, car les doses n'ont pas besoin d'être répétées (104).

Ensuite, il y a les petits ARN interférents (siRNA) qui sont encapsulés dans des nanoparticules lipoïdes (LNP) (100). Ces siRNA vont activer la voie de l'ARN interférent qui se lie de façon intracellulaire au complexe d'extinction induit par l'ARN (RISC). Ceci provoque le clivage de l'ARN messager (ARNm) de PCSK9 qui sera dégradé. Ceci empêche la traduction de la protéine et réduit la concentration de PCSK9 en circulation (105). Une seule administration peut permettre de réduire les niveaux de cholestérol de 59% jusqu'à six mois (106).

1.2.2.4.2.6 *Anti-inflammatoires*

Puisque l'athérosclérose est une maladie inflammatoire, des traitements anti-inflammatoires sont développés pour ralentir le développement de la maladie.

1.2.2.4.2.6.1 Anti-Interleukin-1 β

L'interleukine-1 β (IL-1 β) est une cytokine pro-inflammatoire qui agit sur les cellules endothéliales et les VSMC (107). Le rôle de cette cytokine comprend l'augmentation des molécules d'adhésion des leucocytes. IL-1 β permet d'augmenter la production d'autres cytokines pro-inflammatoires tel que TNF- α et IL-6 et la production de VSMC (107). Donc, des inhibiteurs de cette cytokine ont été développés pour ralentir le développement de l'athérosclérose (107). En effet, chez les animaux tel que les souris et les rats, l'inhibition d'IL-1 β a montré une réduction dans la croissance de la plaque athérosclérotique (107). Pour le traitement de l'inflammation chez l'humain, l'anticorps monoclonal contre IL-1 β , canakinumab de Ilaris[®] réduit les niveaux plasmatiques d'IL-6 et de la protéine C-réactive (CRP) (109). Cependant, l'anticorps n'affecte pas les niveaux de LDL-C, car ces derniers ne sont pas diminués chez les patients qui prennent le médicament (109). De plus, une étude appelée CANTOS menée sur des patients ayant un historique d'infarctus du myocarde a montré une réduction de 15% des infarctus et d'accidents vasculaires cérébraux qui ne sont pas fatales ou de la mortalité causée par des MCV chez les patients traités avec le canakinumab par rapport aux patients traités avec le placebo (109).

1.2.2.4.2.6.2 Colchicine

La Colchicine est un médicament anti-inflammatoire qui est utilisé pour traiter la goutte, la fièvre méditerranéenne familiale et la péricardite (110). Le mécanisme d'action de la molécule affecte plusieurs activités de l'organisme. Tout d'abord, la molécule se lie à la tubuline, ce qui inhibe la formation de microtubules (108, 111). De plus, la molécule diminue l'adhésion et le recrutement des neutrophiles aux tissus enflammés et la sécrétion de cytokines (108, 111). Finalement, la colchicine diminue l'activité de l'inflammasome

NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) qui régule la caspase 1 qui est responsable de l'activation et de la relâche d'IL-1 β (108, 111). Pour les MCV, une étude appelée COLCOT a montré que chez les patients qui prenaient 0,5 mg de colchicine quotidiennement, il y avait une diminution de 23% des ischémies cardiovasculaires par rapport au groupe placebo (110).

1.2.3 Hypercholestérolémie

Un autre facteur de risque important dans le développement de l'athérosclérose est l'hypercholestérolémie familiale (HF). La HF est une maladie génétique caractérisée par des taux élevés de LDL-C dans le plasma (21). La maladie qui porte aussi le nom d'hypercholestérolémie autosomale dominante (112) se trouve sous la forme hétérozygote ou homozygote (21). Les individus porteurs hétérozygotes, qui ont un locus ayant la mutation causale et un locus sans mutation, ont la forme la plus commune de la maladie avec une prévalence d'environ 1 personne sur 250 dans la population générale mais pouvant varier dépendamment des populations (113, 114). La prévalence chez les hétérozygotes au Québec varie selon les régions. En Gaspésie, la prévalence est de 1 :167 alors qu'au Saguenay-Lac-Saint-Jean, elle est de 1 :122 et 1 :81 pour la région de la Côte-Nord (115). Cette forme est la moins sévère avec des concentrations de LDL-C qui sont de 4-5 mmol/L ou 155-190 mg/dL (116). Chez les patients hétérozygotes, les risques de crises cardiaques sont très élevés à partir de 30 à 40 ans (21). Les homozygotes quant à eux ont une mutation causale aux deux locus et ont une prévalence de 1 :130 000-600 000 selon la population (117). Ils ont la forme la plus sévère avec des niveaux de LDL-C supérieurs à 13 mmol/L ou 500 mg/dL chez les adultes et plus grands que 11 mmol/L ou 420 mg/dL chez les enfants (116). Les patients homozygotes développent des xanthomes, des xanthélasmas et des arcs cornéens. Ils possèdent un risque relatif 100 fois plus élevé de développer de l'athérosclérose prématurément. Les homozygotes sont susceptibles d'avoir des crises cardiaques avant l'âge de 20 ans (118).

1.2.3.1 Mutations autosomiques dominantes causant l'hypercholestérolémie familiale

Les différentes mutations présentent chez les patients atteints de l'hypercholestérolémie familiale affectent différentes parties du métabolisme des LDL. Les mutations dominantes affectent le LDLR, l'apoB100 et la proprotéine convertase subtilisine/kexine type 9 (PCSK9), une protéine dont la liaison avec LDLR empêche le recyclage du récepteur.

1.2.3.1.1 Mutations du LDLR

Le LDLR joue un rôle important dans l'internalisation des particules de LDL-C. Cette internalisation permet aux différentes cellules de l'organisme d'utiliser le cholestérol et le LDL de provenance hépatique. Cette internalisation par le foie permet aussi de diminuer la concentration de LDL-C dans le plasma. Cependant, des mutations dans le gène du *LDLR*, qui se trouve dans le bras court du chromosome 19 (19p13.1-13.3) (119) sont la cause la plus fréquente de HF. Les mutations de LDLR affectent 67 % des personnes atteintes de HF avec plus de 1700 mutations répertoriées (130). Il y a cinq classes de mutations qui touchent le gène *LDLR* (Figure 9). Dans la première classe, les mutations sont connues comme « allèles nulles » où le promoteur du gène de LDLR est altéré, empêchant ainsi la production de l'ARN messager (121, 122). Dans la deuxième classe de mutation, le transport du LDLR entre le RE et l'appareil de Golgi de LDLR est complètement ou partiellement bloqué (classe 2A ou 2B respectivement) (121, 123). Dans la troisième classe de mutations, le LDLR est transporté jusqu'à la surface de la cellule, mais il ne peut plus lier son ligand soit l'apoB des particules de LDL (124). Pour la quatrième classe, le LDLR se lie aux LDL, mais le complexe LDLR-LDL n'est pas internalisé (13, 125, 126). Finalement, pour la dernière classe soit la classe 5, le recyclage des LDLR à la surface des cellules est moins efficace, car le récepteur est dégradé dans les lysosomes (127) (Figure 9).

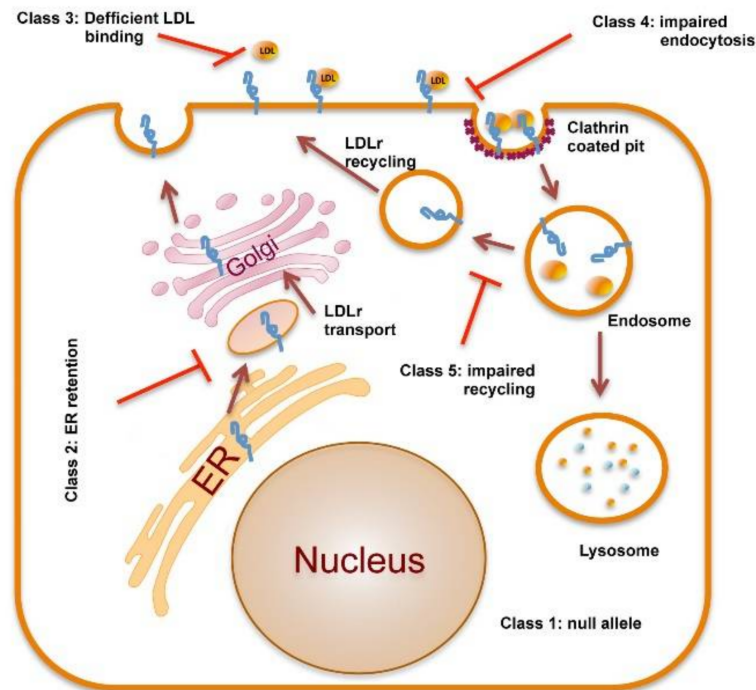


Figure 9 : Les cinq classes de mutations du LDLR

Classe 1 : Mutations « allèles nulles », Classe 2 : Le récepteur n'est pas transporté du RE jusqu'à l'appareil de Golgi, Classe 3 : LDLR n'arrive pas à lier LDL, Classe 4 : Le complexe LDLR-LDL n'est pas internalisé et Classe 5 : LDLR est dégradé dans les lysosomes et n'est plus recyclé à la surface des cellules (33).

ER : Réticulum endoplasmique, LDL : Lipoprotéine de basse densité, LDLR : récepteur de LDL

1.2.3.1.2 Mutations de l'apoB

ApoB est une glycoprotéine qui se trouve sous deux isoformes, l'apoB100 qui est sécrétée par le foie et l'apoB48 qui provient de la sécrétion du petit intestin et qui fait 48% de la taille de l'apoB100 (128). Les deux isoformes sont codés par le même gène *APOB*, mais l'apoB48 provient d'une modification effectuée par l'enzyme intestinale *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1* (ApoBec-1) qui modifie un site spécifique de l'ARN messager de l'*ApoB* où un codon stop est créé, arrêtant prématurément la traduction de l'ARN (128). La forme d'intérêt qui se trouve à la surface des particules de LDL est l'apoB100 qui possède l'épitope permettant la liaison au récepteur des LDL (128). Or, chez 16% de la population atteinte de HF, il y a des mutations au gène *APOB* qui est situé au locus 2p23-p24 sur le bras court du chromosome 2 (129, 130). Cette forme de HF est connue sous le nom de *Familial defective apolipoprotein B100* (FDB). Quatre mutations différentes de apoB100 empêchent sa liaison au récepteur des LDL (130). La première mutation (R3500Q) est une substitution d'une glutamine par une arginine au codon de l'acide aminé à la position 3500 (132). La deuxième mutation est le

R3500W au codon de l'acide aminé à la position 3500 où l'arginine est substituée par le tryptophane (133). La troisième mutation est la R3531C qui est due à la substitution de l'arginine en cystéine au codon de l'acide aminé à la position 3531 (134). Finalement, la dernière mutation appelée R3480P où l'acide aminé à la position 3480 soit l'arginine est substituée en proline (135). Puisque ces mutations empêchent la liaison de LDL à LDLR, les particules de LDL-C continuent de circuler dans le plasma et de s'accumuler.

1.2.3.1.3 Mutation de PCSK9

Un autre gène impliqué dans le développement de l'HF est *PCSK9* au locus 1p34.1-p32 (130). Tout d'abord, il faut comprendre l'interaction entre PCSK9 et LDLR. La proPCSK9 qui est synthétisée par le foie subit un clivage autocatalytique du prosegment à la séquence VFAQ152↓ (96, 136). Ceci provoque un changement de conformation où le prosegment reste lié de façon non-covalente au domaine catalytique de PCSK9 (136). PCSK9 passe ensuite du RE vers l'appareil de Golgi où elle sera modifiée et ensuite sécrétée dans le sang. La protéine mature n'est pas active de façon enzymatique. Par son domaine catalytique, PCSK9 se lie au domaine facteur de croissance épidermique A (EGF(A)) du LDLR qui se trouve sur la membrane cellulaire des hépatocytes (30). Par la suite, le complexe PCSK9-LDLR est internalisé dans l'hépatocyte par endocytose clathrine-dépendante. Le pH dans l'endosome diminue et l'affinité entre PCSK9 et LDLR augmente de 10X (30). Ceci empêche LDLR de changer de conformation lui permettant d'être recyclé vers la surface cellulaire et est plutôt dirigé vers les lysosomes où il sera dégradé. En présence de PCSK9, la conformation fermée avec une interaction intramoléculaire entre L4-L5 et β -propeller de LDLR est favorisée dans le milieu acide empêchant son recyclage (30) (Figure 10). Chez 2% des personnes souffrant de HF, des mutations gain de fonction au niveau du gène de PCSK9 sont la cause de la maladie (130, 137). Certaines mutations causent une augmentation de l'affinité de liaison entre PCSK9 et LDLR alors que d'autres mutations causent l'augmentation de l'expression de PCSK9. Cette augmentation de l'affinité ou de la quantité de PCSK9 a pour effet de diminuer le recyclage du récepteur et d'augmenter sa dégradation. Donc, cela provoque une diminution de la quantité de récepteurs à la surface des hépatocytes. Ceci diminue l'internalisation des

LDL et les niveaux de LDL-C dans le plasma sont alors augmentés (224). Dans une étude réalisée par Pisciotta *et al.* deux sœurs hétérozygotes ayant une mutation du LDLR et une mutation de PCSK9 avaient des niveaux de LDL-C 44% plus élevés que les membres de leur famille ayant une mutation du LDLR seulement (138).

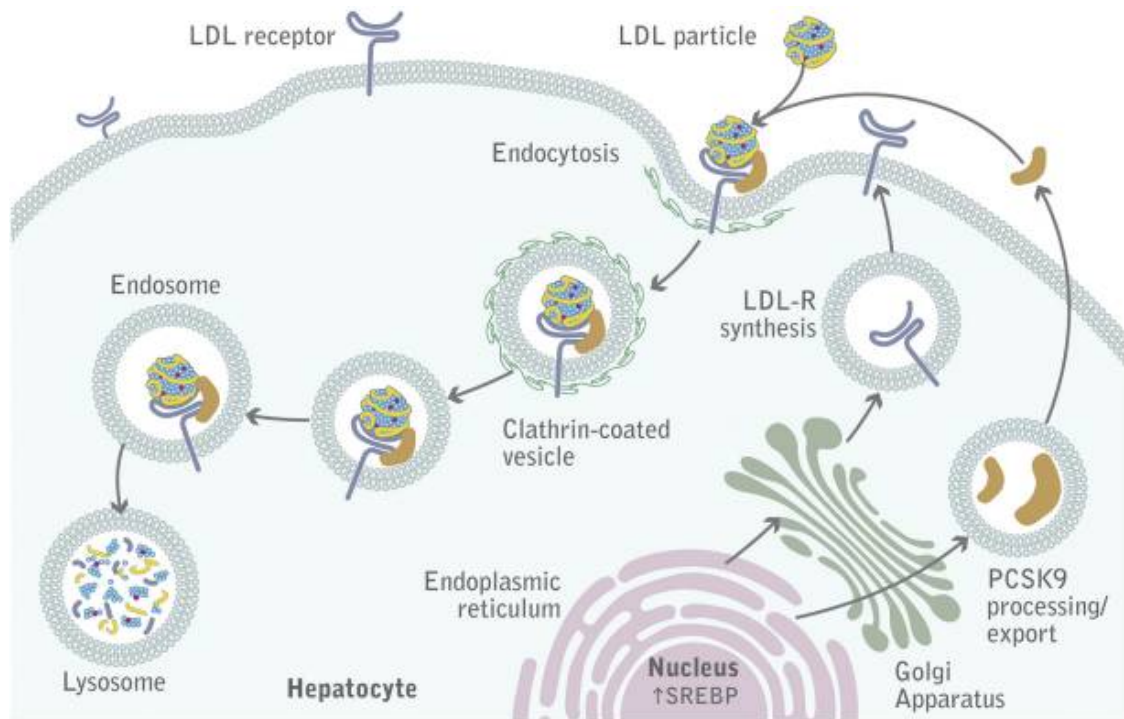


Figure 10 : L'effet des mutations gain de fonction de PCSK9 sur l'internalisation de LDLR

Métabolisme du cholestérol en présence d'une mutation gain de fonction de PCSK9 causant une augmentation de l'activité de la convertase de proprotéines. L'augmentation de la liaison de PCSK9 à LDLR provoque une augmentation de la dégradation du récepteur dans les lysosomes, ce qui empêche son recyclage (224).

LDL : lipoprotéine de basse densité, LDL-R : Récepteur de LDL, PCSK9 : Proprotéine convertase subtilisine/kexine type 9, SREBP : Sterol regulatory element-binding protein.

Les personnes ayant des mutations perte-de-fonction de PCSK9 ont un risque plus faible de développer des maladies cardiovasculaires (139). Les sujets qui ont une mutation non-sens nommée PCSK9^{142X}, la tyrosine à la position 142 est remplacée par un codon *stop*. Pour les sujets ayant une mutation PCSK9^{679X}, c'est la cystéine à la position 679 qui est remplacée par un codon *stop*. Les sujets ayant ces mutations perte-de-fonction de PCSK9 ont une diminution de 28% à 40% des niveaux de LDL-C dans le plasma (140). L'étude rétrospective de Cohen *et al.* réalisée sur une période de 15 ans a montré une

réduction de 88% du risque de développer des maladies cardiovasculaires chez les sujets ayant une de ces mutations non-sens de PCSK9 (Y142X ou C679X) (139).

1.2.3.1.4 Mutation au locus HCHOLA4

Une étude génétique menée sur une famille dont plusieurs membres étaient atteints d'HF, mais dont les trois gènes connus pour causer la maladie n'avaient aucune mutation a permis de découvrir un quatrième locus impliqué dans l'apparition de l'HF (141). Le quatrième locus est nommé HCHOLA4 et se situe à 16q22.1. La région possède 154 gènes (141). Pour déterminer le gène spécifique responsable du développement de l'hypercholestérolémie, Marques-Pinheiro *et al.* ont séquencé 57 gènes sur les 154 gènes du locus. Aucun de ces gènes n'a montré de mutation pouvant entraîner le développement de l'hypercholestérolémie (141).

1.3 Golgi apparatus protein 1 (GLG1)

GLG1 (*Golgi apparatus protein 1*) est localisée au locus 16q22.1. Dans l'étude de Marques-Pinheiro *et al.*, le gène de GLG1 n'a pas été séquencé. Son rôle dans le développement de l'hypercholestérolémie n'a pas été confirmé ou infirmé par cette étude. Des études dans notre laboratoire ont montré que GLG1 serait impliquée dans le développement de l'hypercholestérolémie (section 1.3.2.2). Étant une protéine très peu étudiée, le mécanisme d'action et la régulation post-traductionnelle de GLG1 sont peu connus.

1.3.1 GLG1

GLG1 est une protéine de 160 kDa qui porte plusieurs noms dépendamment de l'espèce dans laquelle la protéine a été identifiée. La protéine identifiée chez les souris porte le nom de *E-selectin ligand 1* (ESL-1) (142), alors que la protéine identifiée chez les embryons du poulet porte plutôt le nom de *Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor* (CFR) (143). Elle porte aussi le nom de *Latent transforming growth factor- β complex* (LTBP-1) (144) et MG-160 (145). Le gène codant pour GLG1 est localisé sur le

chromosome 16 au locus 16q22-q23 chez l'humain (145). Chez la souris, la protéine se trouve sur le chromosome 8 (142). La protéine ubiquitaire est formée de 1179 acides aminés (aa) chez l'humain et de 1175 aa chez la souris (147). GLG1 humain possède un peptide signal de 29 aa, une partie N-terminale extracellulaire de 1116 aa, un domaine transmembranaire de 21 aa et une partie C-terminale intracellulaire de 13 aa (Figure 11). Il existe trois isoformes de GLG1 humain, le premier isoforme est celui de 1179 aa, alors que le deuxième contient 1203 aa où le C-terminal présente une extension de 24 aa. Le troisième isoforme est formé de 1192 aa, dû à un ajout de 24 aa en C-terminal et une délétion des aa 147-157 dans la partie N-terminale (147). GLG1 possède 16 répétitions d'un domaine riche en cystéine dans sa partie extracellulaire (148). GLG1 est une protéine transmembranaire localisée dans l'appareil de Golgi et à la surface des cellules. Elle peut aussi être clivée dans sa partie extracellulaire et être relâchée dans le milieu environnant (148). GLG1 est glycosylée avec cinq sites de glycosylation (Figure 11) présents dans sa structure primaire (148).

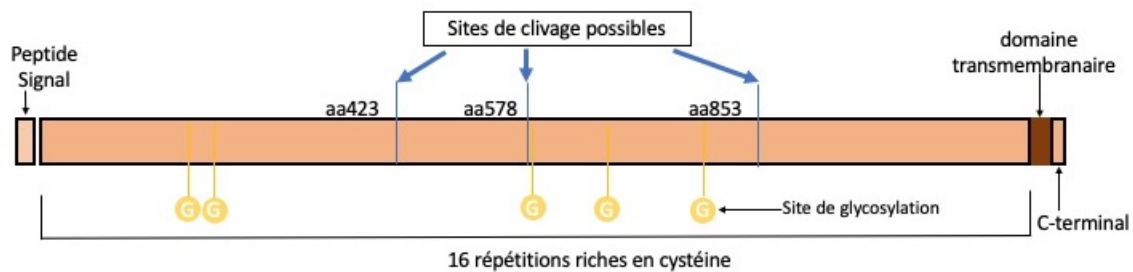


Figure 11 : Schéma représentatif de la structure primaire de GLG1

GLG1 est une protéine transmembranaire de 160 kDa avec 16 répétitions du domaine riche en cystéine. Les G sur le schéma sont les sites de glycosylation de la protéine. Il y a trois sites de clivage présentés dans l'étude d'Antoine *et al.* (148) qui sont identifiés sur le schéma soit aa423, aa578 et aa853.

1.3.2 Rôles de GLG1

1.3.2.1 Rôle de GLG1 dans l'athérosclérose

1.3.2.1.1 GLG1 et le roulement leucocytaire

GLG1 est un ligand de la E-sélectine et joue un rôle dans le roulement des leucocytes. Une étude menée par Steegmaier *et al.* a démontré que GLG1 est exprimée

dans l'appareil de Golgi mais aussi à la surface et sur les microvillosités des leucocytes (150). Pour pouvoir lier la E-sélectine, GLG1 doit subir une modification post-traductionnelle où la protéine est fucosylée (α 1,3-fucosylation) (151). Une étude a montré que dans les cellules CHO (cellules d'ovaires de hamster de Chine), les α 1,3-fucosyltransférases (Fuc-TIV et Fuc-TVII) vont permettre de générer un épitope de type sialyl Lewis x (sLe^x-like) qui va s'ajouter à GLG1 (151). En absence de la α 1,3-fucosylation, il y a une réduction importante de la liaison de GLG1 avec la E-sélectine (151). Cette glycoforme de la protéine se trouve seulement sur les cellules myéloïdes et certaines cellules lymphoïdes (150). Pour recruter des leucocytes, GLG1 collabore avec *cluster of differentiation 44* (CD44) et la *P-selectin glycoprotein-1* (PSGL-1) qui sont des ligands de la E-sélectine et de la P-sélectine respectivement. Ainsi, GLG1 permet de faire la liaison entre le rôle de PSGL-1 et de CD44. GLG1 va permettre la capture initiale des leucocytes en coopérant avec PSGL-1 et par la suite, coopérer avec CD44 pour contrôler la vitesse du roulement des leucocytes (152).

1.3.2.1.2 GLG1 et l'athérosclérose

L'implication de GLG1 sur la fonction des leucocytes à se lier aux cellules endothéliales (152) a initié une étude menée par Luo *et al.* pour déterminer l'effet de la déficience de GLG1 sur le développement de l'athérosclérose. Dans l'étude, des souris *Apoe*^{-/-} hypercholestérolémiques ont été croisées avec des souris de génotype *Glg1*^{+/-}. Les souris hétérozygotes hypercholestérolémiques (*Apoe*^{-/-} et *Glg1*^{+/-}) ont une augmentation du roulement des leucocytes, mais une diminution de l'adhérence de ces cellules comparativement aux souris de type sauvage pour GLG1 (*Apoe*^{-/-} et *Glg1*^{+/+}) (153). Ils ont utilisé l'Oil-Red-O (ORO) qui est un colorant qui permet de visualiser les lipides dans les plaques de l'aorte des souris pour pouvoir quantifier l'athérosclérose. Ils ont trouvé qu'il n'y avait pas de différence dans la surface des plaques de l'aorte entre les souris *Apoe*^{-/-}/*Glg1*^{+/-} et les souris *Apoe*^{-/-}/*Glg1*^{+/+}. De plus, il n'y avait pas de différence dans l'épaisseur de la lésion entre les souris de ces deux génotypes. Les souris *Apoe*^{-/-}/*Glg1*^{+/-} ont des dépôts de collagène plus grand et une diminution du taux de macrophages à l'endroit de la lésion. Dans le foie des souris *Apoe*^{-/-}/*Glg1*^{+/-}, l'expression de l'ARN messager du *cluster of differentiation 68* (CD68) est réduite avec un résultat de $1,24 \pm 0,11$ comparativement à

1,69 ± 0,11 pour les souris de type sauvage. CD68 est un récepteur qui est exprimé à la surface des macrophages et est utilisé comme marqueur pour la présence de ces cellules (154). Finalement, GLG1 pourrait jouer un rôle important le développement de l'athérosclérose en interagissant avec l'adiponectine (APN).

1.3.2.1.3 GLG1 et l'adiponectine

L'adiponectine (APN) se trouve dans le groupe d'hormones des adipocytokines, secrétée par les adipocytes. Une étude menée par Ouchi *et al.* a révélé que l'APN a un effet inhibiteur sur les molécules d'adhésion dont la E-sélectine ainsi que sur l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales (155). L'APN possède un effet inhibiteur sur la formation de cellules spumeuses à partir de macrophages et permet d'inhiber la prolifération des cellules du muscle lisse (155). Une étude menée par Yamamoto *et al.* a montré que GLG1 se lie avec l'APN et que cette liaison empêche GLG1 de se lier à la E-sélectine, ce qui a pour effet de diminuer le roulement des leucocytes (156). L'APN pourrait alors ralentir la progression de l'athérosclérose (155). L'étude de Yamamoto *et al.* montre aussi que l'interaction de GLG1 et l'APN n'est pas au même site que l'interaction de GLG1 et de la E-sélectine qui interagissent ensemble via un site N-glycosylé (156). Le site d'interaction proposé de liaison de GLG1 avec APN se trouve plutôt au segment GQGQGP à l'aa6 jusqu'à l'aa10 dans le N-terminal de GLG1 (156).

1.3.2.2 GLG1 et le métabolisme des lipides

GLG1 fut identifiée par notre laboratoire comme partenaire d'interaction de PCSK9 (Samami *et al.*, en préparation). Des expériences de spectrométrie de masse, de co-immunoprécipitation et de microscopie confocale par immunofluorescence ont montré que PCSK9 interagit avec GLG1. Ces expériences ont aussi montré que GLG1 interagit avec LDLR et apoB100 dans des cellules Huh7 qui sont des cellules humaines hépatiques. Dans ces cellules, lorsque l'expression de GLG1 a été diminuée à l'aide d'un siRNA, cela a entraîné une diminution de la sécrétion d'apoB. Cela pourrait être dû à une augmentation de l'agrégation de l'apoB100 dans la région périnucléaire et à sa dégradation par autophagie. Pour la partie *in vivo*, des adénovirus associés ont été utilisés pour diminuer

l'expression de GLG1 et une diminution dans les niveaux plasmatiques de LDL-C, VLDL-C, PCSK9 et de TG a été observée (Samami *et al.*, en préparation). Dans une deuxième étude effectuée dans le laboratoire, un *knockdown* de GLG1 dans les souris hypercholestérolémiques, *ApoE*^{-/-}, a montré une réduction significative des taux plasmatiques de cholestérol total, de VLDL-C et de LDL-C. Chez ces souris, une diminution des lésions athérosclérotiques au niveau du sinus aortique a été observée (Ardo *et al.*, en préparation). Tous ces résultats mènent à croire que le gène de GLG1 joue possiblement un rôle dans la régulation du métabolisme lipidique et l'hypercholestérolémie familiale.

1.3.2.3 GLG1 et le développement du squelette

1.3.2.3.1 GLG1 et l'interaction avec FGF18

GLG1 joue aussi un rôle dans le développement du squelette. Une étude menée par Miyaoka *et al.*, a révélé que les souris *Glg1*^{-/-} ont une queue tordue, des problèmes de croissance et une fente palatine (159). GLG1 est exprimée dans les cellules à partir de l'embryogenèse et serait essentielle pour le développement puisque 90% des souris *Glg1*^{-/-} meurent deux jours après la naissance (159). GLG1 interagit avec le facteur de croissance des fibroblastes 18 (FGF18) via son domaine intracellulaire (159). Les souris qui sont déficientes en FGF18 soit les *Fgf18*^{-/-} ont des phénotypes qui sont similaires à ceux de *Glg1*^{-/-} tel que la queue tordue, la fente palatine et les problèmes de croissance. GLG1 interagit aussi avec le *transforming Growth Factor-beta* (TGF- β). Elle se lie à pro-TGF- β et permet de limiter la maturation de TGF- β par la Furine. Ceci permet aux chondrocytes qui se trouvent à la plaque de croissance de proliférer (160). En absence de GLG1, les souris ont un retard de croissance et de la maturation squelettique appelée dysplasie squelettique. Ces souris ont des os plus courts et plus minces (160). Cette interaction entre GLG1 et TGF- β jouerait aussi un rôle dans l'homéostasie des os. En effet, en absence de GLG1, il y a une augmentation de la maturation des TGF- β , ce qui cause une ostéopénie, une diminution de la formation des os et une augmentation de la résorption osseuse (160).

1.3.2.4 GLG1 et l'obésité

1.3.2.4.1 GLG1 et l'interaction avec Preadipocytes factor 1

Preadipocyte factor 1 (Pref-1) aussi appelée *delta-like protein* (Dlk) est une protéine transmembranaire qui empêche la différenciation des adipocytes. Pref-1 est exprimée dans les préadipocytes et son expression diminue durant la différenciation (161). Dans les adipocytes matures, Pref-1 n'est plus exprimée. Lorsque des fibroblastes d'embryons de souris *Pref-1^{-/-}* sont différenciés artificiellement, 90% des fibroblastes se différencient en adipocytes comparativement à 50% pour les cellules qui proviennent de souris de type sauvage (162). Dans une étude menée par Miyaoka *et al.*, ils ont suggéré que GLG1 et Pref-1 interagissent ensemble, car GLG1 co-immunoprécipite avec Pref-1 (159). Ils suggèrent que lorsque Pref-1 et GLG1 interagissent ensemble, cela empêche GLG1 d'interagir avec FGF18, ce qui empêche GLG1 de réguler la signalisation de FGF18 tel que décrit plus haut. Les souris *Glg1^{-/-}* et les souris qui surexpriment Pref-1 ont un phénotype similaire avec des souris ayant une queue tordue et un retard de croissance, ce qui indiquerait que GLG1 et Pref-1 ont des fonctions opposées (159).

1.3.2.4.2 GLG1 et la formation d'adipocytes

Des études ont aussi montré que GLG1 pourrait être impliquée dans l'adipogénèse. Un effet intéressant de l'inhibition de GLG1 est le fait que les souris *Glg1^{-/-}* ont une taille et un poids significativement plus petit que ceux de type sauvage (159). Une autre étude effectuée par nos collaborateurs (article non publié) montre que les souris *Glg1^{-/-}* qui survivent ont un plus grand nombre d'adipocytes mais que les cellules sont de plus petite taille.

1.3.3 Clivage de GLG1

Selon une étude menée par Antoine *et al.*, GLG1 est clivée en plusieurs endroits dans sa partie extracellulaire (148). Dans cette étude, le milieu des cellules COS-1 surexprimant GLG1 a été prélevé et analysé par immunobuvardage à la Western et la

présence de deux fragments d'environ 150 kDa et de 55 kDa a été observée (148). Pour déterminer les enzymes responsables du clivage de GLG1, la structure primaire de la protéine a été étudiée. GLG1 possède plusieurs sites de clivage possibles des proprotéines convertases subtilisine kexine (PCSK) (148). Elle possède aussi plusieurs sites de clivage des métalloprotéases matricielles, dont un site de clivage possible de MMP-2 au codon 653 (148). Selon ces observations, l'équipe d'Antoine *et al.* ont traité les cellules avec le decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketone (dec-RVKR-CMK/decCMK) qui est un inhibiteur des PCSK et avec le GM6001 qui est un inhibiteur des métalloprotéases de la matrice (MMP). En présence de decCMK, le fragment de 55 kDa n'était plus détecté dans le milieu des cellules. Cependant, en présence de GM6001, le fragment de 55 kDa était toujours détecté dans le milieu de culture (148). Les auteurs ont émis l'hypothèse que GLG1 est clivée par une PCSK vu l'absence de fragments en présence de decCMK. GLG1 étant possiblement clivée par une PCSK, trois sites de clivage potentiels ont été localisés. Ces sites sont aa423, aa578 et aa853 (Figure 11) (148). De plus, puisque GLG1 est une protéine transmembranaire, des études ont montré que la protéine est clivée près de la membrane et que son domaine N-terminal est libéré dans le milieu extracellulaire alors que le domaine transmembranaire et le C-terminal restent attachés à la membrane (149, 159).

Tableau 2 : Effet des inhibiteurs DecCMK et GM6001 sur la sécrétion des fragments de GLG1 selon l'étude menée par Antoine *et al.*

Nom de l'inhibiteur	Cible	Fragments présents dans le milieu des cellules	
		Fragment de 150 kDa	Fragment de 55 kDa
Sans inhibiteur		Présent	Présent
DecCMK	Convertases de proprotéines (PCSK)	Présent	Absent
GM6001	Métalloprotéases matricielles (MMP)	Présent	Présent

1.4 Enzymes potentiellement impliquées dans le clivage de GLG1

1.4.1 Protéases à sérine

La diversification du protéome est causée entre autres par des modifications post-traductionnelles qui ont un effet sur la fonction de certaines protéines. Ces modifications vont aussi permettre d'activer ou d'inactiver certaines protéines. Il y a plusieurs modifications post-traductionnelles qui peuvent affecter la fonction des protéines. Parmi celles-ci on retrouve la protéolyse qui est irréversible où la protéine d'intérêt est clivée à un site spécifique par des enzymes protéolytiques (165, 166). Il y a sept classes de protéases qui peuvent hydrolyser les liens peptidiques des protéines dont les sérines protéases. Cette classe d'enzymes est divisée en 13 clans et 40 familles (163). Ces enzymes sont caractérisées par une triade catalytique formée des acides aminés sérine-histidine-aspartate. La sérine se trouvant dans le site actif des enzymes est nucléophile (164). Dans cette classe, il y a le clan des proprotéines convertases subtilisine kexine (PCSK) qui possèdent la triade catalytique de sérine-histidine-aspartate caractéristique des sérines protéases (166, 167) et qui sont les enzymes potentiellement responsables du clivage de GLG1.

1.4.1.1 PCSK

1.4.1.1.1 Activité et clivage

Le clan des proprotéines convertases subtilisine kexine est formé de neuf membres, PCSK1, PCSK2, Furine, PCSK4, PCSK5, PCSK6, PCSK7, SKI-1 et PCSK9 (165). Les sept premières PCSK sont responsables de l'activation de plusieurs polypeptides incluant des hormones, des enzymes, des facteurs de croissance et leurs récepteurs et des molécules d'adhésion. Elles peuvent aussi désactiver certaines protéines telles que LPL et la lipase endothéliale (EL) avec un clivage protéolytique (169). Ces sept membres hydrolysent les liens peptidiques au niveau d'acides aminés basiques et clivent en C-terminal du motif $(R/K)X_n(R/K)\downarrow$ où le X représente tous les acides aminés et n doit être

0, 2, 4 ou 6 (171,172). En ayant le même site de clivage, il y a une redondance du clivage des proprotéines par les PCSK, plus particulièrement entre les substrats de la Furine, PCSK5, PCSK6 et PCSK7 (165).

SKI-1 joue un rôle important dans le contrôle de la synthèse des acides gras et du cholestérol. En effet, SKI-1 est responsable du premier clivage des SREBPs menant à leur activation et l'expression des gènes lipogéniques (section 1.1.2.2.1) (173). Son motif de clivage est différent de celui des autres PCSK puisque SKI-1 clive à un résidu non-basique et en C-terminal du motif RX(L/V/I)X↓ où X représente tous les acides aminés sauf proline et cystéine (172).

1.4.1.1.2 Localisation, distribution tissulaire et fonction in vivo

Il y a une distinction pour l'expression tissulaire et la localisation subcellulaire entre les différentes convertases de proprotéines et ces différences déterminent la sélectivité de chaque enzyme pour un substrat particulier et spécifique (165). PCSK1 et PCSK2 sont présentes dans les glandes neuroendocrines et sont localisées dans les granules de sécrétion à pH acide (174). PCSK1 est primordiale pour la survie des embryons. La majorité des souris *knockout* (*Pcsk1*^{-/-}) meurent à la naissance (225). En effet, une étude par Zhu *et al.* montre que 21 souris sont nées avec le phénotype *Pcsk1*^{-/-} et que seulement 7 de ces souris soit 33% survivent après 7 jours suivant la naissance (225). Les 14 autres souris *Pcsk1*^{-/-} meurent entre le jour 1 à 7 (225). Les souris ayant survécus ont des problèmes de croissance. Puisque ces souris n'expriment pas PCSK1, le précurseur de l'hormone de libération de l'hormone de croissance (proGHRH), entre autres et l'hormone de libération de l'hormone de croissance mature (GHRH) ne sont alors pas clivés et ne sont pas activés (174). Pour les souris *Pcsk2*^{-/-}, entre autres, elles souffrent d'hypoglycémie, car le proglucagon n'est pas clivé en absence de PCSK2 et le glucagon mature n'est pas libéré (165, 168). Pour la Furine et PCSK7, elles sont ubiquitaires dans tous les tissus et sont localisées dans le réseau *transgolgien*, à la surface des cellules et dans les endosomes (165, 170). Les souris Furine (*Fur*^{-/-}) *knockout* ne survivent pas durant l'embryogénèse et meurent entre les jours embryonnaires 10,5 et 11,5 à cause d'une insuffisance hémodynamique due à une malformation dans les ventricules qui empêche leur fermeture

(175). Les souris présentant un génotype *Fur*^{-/-} développent des vaisseaux capillaires de façon désorganisée et les capillaires vitellins ne se développent pas. Les cellules sanguines se regroupent à une section du sac vitellin. Ceci aboutit au développement d'îlots sanguins (175). PCSK7 colocalise avec plusieurs protéines. Par exemple, elle est colocalisée avec le *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) dans l'hippocampe et l'amygdale et permet l'activation du pro-BDNF en BDNF, une protéine qui joue un rôle dans la différenciation et la plasticité neuronale. En absence de PCSK7, les niveaux protéiques de BDNF diminuent de 40% dans ces régions du cerveau (hippocampe et amygdale) (176). Les souris *Pcsk7*^{-/-} ont une déficience dans certaines capacités émotionnelles et cognitive tel que la mémoire (176). SKI-1 est localisée dans l'appareil de Golgi cis ou médial (165). Les souris *Ski-1*^{-/-} meurent au stade de blastocystes (177). Ces souris n'ont pas une formation d'un épiblaste et l'implantation n'a pas lieu (165, 232). De plus, tel que décrit dans la section 1.1.2.2.1, SKI-1 clive SREBP pour permettre la relâche de ce dernier pour qu'il se lie au SRE (23, 24). Lorsque l'expression de SKI-1 est diminuée de 70% à 90% dans le foie des souris, cela entraîne la diminution de l'expression de l'ARN messager de LDLR de 50% accompagnée d'une diminution de la synthèse du cholestérol dans le foie de 75% (232). PCSK4 se trouve dans les tissus germinaux à la surface des cellules. L'absence de cette protéine cause des problèmes de fertilité (178). En effet, les souris fertilisées avec les spermatozoïdes de type sauvage ont un succès de fertilisation de 34% comparativement à 12% pour les souris fertilisées avec les spermatozoïdes *Pcsk4*^{-/-} (178). De plus, chez le type sauvage, 19% des embryons se rendent au stade de blastocystes, alors que le taux est de 0% chez les souris *Pcsk4*^{-/-} (178) (Tableau 3).

PCSK5 et PCSK6 sont exprimées dans tous les tissus, plus particulièrement dans l'intestin, le foie et les reins (179). Elles se trouvent à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire. Les souris *Pcsk5*^{-/-} meurent entre le stade d'implantation des blastocystes (E4.5) et après le stade de la formation de la plaque neurale (E7.5) (179). Chez les souris *Pcsk5*^{-/-}, les reins ne se développent pas. En effet, PCSK5 via son substrat *Growth differentiation factor 11* (GDF11) régule la néphrogénèse. Chez les patients présentant le syndrome de VACTERL (malformation vertébrale, anorectale, cardiaque, trachéo-oesophagiennes, rénale et des membres), une mutation au gène de PCSK5 est présente

(179). Finalement, les souris *Pcsk6*^{-/-} ont une malformation craniofaciale (180). De plus, chez les embryons *Pcsk6*^{-/-}, le taux de mortalité embryonnaire est de 25% et est causé par une malformation cardiaque dû à une anomalie dans la communication interventriculaire (180) (Tableau 3).

Tableau 3 : Distribution tissulaire, motif de clivage et effet du *knockout* des différentes convertases de proprotéines (165)

Noms	Distribution tissulaire	Motifs de clivage	Effet du <i>knockout</i>
PCSK1/PC1	Neuroendocrine	(R/K) X_n (R/K)↓	Mort embryonnaire et problème de croissance
PCSK2/PC2	Neuroendocrine	(R/K) X_n (R/K)↓	Hypoglycémie
PCSK3/Furine	Ubiquitaire	(R/K) X_n (R/K)↓	Mort embryonnaire causée par une insuffisance hémodynamique
PCSK4/PC4	Germinale	(R/K) X_n (R/K)↓	Problème de fertilité
PCSK5/PC5	Intestin, ovaire, reins et cortex surrénal	(R/K) X_n (R/K)↓	Mort après le stade d'implantation des blastocystes
PCSK6/PACE4	Muscle, cœur, intestin, reins et cervelet	(R/K) X_n (R/K)↓	Malformation craniofaciale
PCSK7/PC7	Ubiquitaire	(R/K) X_n (R/K)↓	Déficience dans certaines capacités émotionnelles et cognitives
PCSK8/SKI-1/S1P	Ubiquitaire	RX(L/V/I)X↓	Mort au stade de blastocystes
PCSK9/NARC-1	Foie, intestin et reins	(V/I/L)FAQ↓	Diminution des niveaux de LDL-C avec une augmentation des niveaux de LDLR

1.4.1.1.3 Activation des convertases de proprotéines

Toutes les PCSK sont synthétisées dans la voie de sécrétion et possèdent un peptide signal et ont un prodomaine N-terminal qui sert de chaperon intramoléculaire. Elles ont ensuite un domaine catalytique apparenté aux subtilisines bactériennes et aux kexines des levures (*subtilisin-like*), un domaine protéique (P-domaine) et un domaine C-terminal qui diffère pour chaque PCSK (181). Pour devenir actives, les convertases de proprotéines doivent subir des modifications post-traductionnelles. Lors de leur passage dans le RE rugueux, les pré-proenzymes perdent leur peptide signal par l'action de la peptidase-signal et sont N-glycosylées. Les PCSK vont alors se replier dans la lumière du RE en une conformation active à l'aide du prodomaine, ce qui permet un clivage autocatalytique intramoléculaire au site primaire du prosegment (181). Le prosegment ainsi clivé reste lié au domaine catalytique et la protéase demeure inactive. Elle est ensuite libérée du RE. La protéase est ensuite transportée dans l'appareil de Golgi où elle subira d'autres modifications post-traductionnelles (170). L'activation des PCSK se produit dans différents compartiments cellulaires tels que le réseau trans-golgien ou cis-golgien. Dans ces compartiments, le prosegment est clivé pour une deuxième fois, ce qui permet la libération de l'enzyme active de son prosegment inhibiteur (170). L'activation de SKI-1 se produit dans l'appareil de Golgi cis ou médial. L'activation de la Furine, PCSK5, PCSK6 et PCSK7 a lieu dans le réseau trans-golgien. PCSK6 et PCSK5 peuvent aussi être activées à la surface des cellules. Finalement, PCSK1 et PCSK2 sont activées dans les granules de sécrétion (170). PCSK9 est particulière, puisqu'elle n'est pas une enzyme active, car le prosegment ne subit pas un deuxième clivage et reste lié au domaine catalytique et inhibe son activité enzymatique (136).

1.4.1.2 Protéases à sérine apparentées à la trypsine

Un autre clan important des protéases à sérine est celui des protéases à sérine apparentées à la trypsine (*trypsin-like*) qui est le plus grand groupe de protéases dans le génome humain (164). Dans ce clan, il y a entre-autres une enzyme que l'on trouve dans le système digestif qui est la trypsine et une se trouvant dans le système cardiaque qui est la corine (183, 230). L'étude des protéases à sérine a été amorcée avec la caractérisation de la chymotrypsine dont le domaine catalytique est formé d'un trio de résidus qui sont

l'histidine-aspartate-sérine (164). Ce trio catalytique se trouve dans toutes les protéases à sérine qui sont dans le clan des *trypsin-like* (164). Cependant, la chymotrypsine et la trypsine clivent les protéines à des sites différents. La trypsine clive aux résidus chargés positivement tel que l'arginine et la lysine alors que la chymotrypsine va plutôt cliver aux résidus qui sont hydrophobes tel que la tyrosine, la phénylalanine et la thréonine (164). Les enzymes dans le clan des *trypsin-like* vont avoir un motif de clivage similaire à la trypsine (183). L'activation des protéases à sérine apparentée à la trypsine se fait après la sécrétion de la protéase dans matrice extracellulaire, le plasma et d'autres fluides corporels (183). De plus, le clivage protéolytique du propeptide est requis pour générer une protéase active (164). En effet, lorsque le propeptide est clivé, une nouvelle extrémité N-terminale est créée, ce qui s'appelle N-terminale naissant. Ce N-terminal naissant va induire un changement de la conformation de l'enzyme (164). Ce changement de conformation va à son tour induire à la formation d'une interaction électrostatique intramoléculaire avec l'aspartate à la position 194 (Asp194). Cette interaction va permettre de stabiliser le site de liaison du substrat des *trypsin-like* (164).

1.4.2 Les métalloprotéases matricielles

Une autre famille d'enzymes protéolytiques est la famille des métalloprotéases matricielles (MMP). Les MMP jouent aussi un rôle important dans le développement de l'athérosclérose et possèdent plusieurs sites de clivage dans la structure primaire de GLG1. Les MMP sont produites par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules du muscle lisse entre autres (184). En présence d'oxyde nitrique (NO), la production de MMP est inhibée alors que le stress oxydatif permet de stimuler la production des métalloprotéases (184). Elles clivent leurs substrats en avant d'un résidu hydrophobique. Ces enzymes ciblent les composantes de la matrice extracellulaire tel que le collagène, l'élastine, les molécules chimiotactiques, les molécules d'adhésion cellulaire et les facteurs de croissance (185).

Dans l'athérosclérose, les MMP augmentent la migration des cellules du muscle lisse vers l'intima, ce qui contribue à la formation de la plaque athérosclérotique (184). En

effet, les MMP vont dégrader la membrane basale, ce qui va permettre de faciliter les interactions entre la matrice extracellulaire et les intégrines et permettre la migration (218). Cependant, les MMP sécrétées par les cellules spumeuses dérivées principalement de macrophage (MMP-9, MMP2, MMP-8, MMP-1) diminuent la taille de la plaque en dégradant la matrice extracellulaire de la chape fibreuse (section 1.2.2) (75). De plus, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les phagocytes pourrait réguler l'activation des MMP durant l'inflammation, mais cette hypothèse reste à confirmer (190).

1.4.2.1 Membres de la famille des métalloprotéases matricielles

Les MMP portent aussi le nom de matrixines. Cette famille est formée de 25 membres (185). Il y a trois caractéristiques communes qui sont présentes chez tous les membres de la famille (186) :

- 1- Homologie de séquence avec MMP-1
- 2- Motif PRCGXPD dans leur propeptide
- 3- Motif qui se lie au zinc (HEXGHXXGXXH) est dans leur domaine catalytique

Les MMP sont divisées en six groupes soit les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, matrilysines, les MMP de type membranaire et les MMP non-classifiées (186). Le premier groupe comprend les collagénases tel que MMP-1, MMP-8, MMP-13 et MMP-18 qui clivent le collagène interstitiel plus précisément le collagène de type I, II et III (186). Ensuite, il y a les gélatinases tel que MMP-2 et MMP-9 qui digèrent le collagène et les gélatines qui sont dénaturées (186). MMP-2 digère le collagène de type I, II et III. Cependant, MMP-9 ne peut pas digérer ces types de collagène (186). Le troisième groupe sont les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) qui digèrent les éléments de la matrice extracellulaire (fibronectines, laminine, élastine et protéoglycans) et activent certaines pro-MMP tel que MMP-1, MMP-7 et MMP-9 (186, 187). Les matrilysines (MMP-7 et MMP-26) forment le quatrième groupe et elles s'occupent de la digestion des molécules dans la matrice extracellulaire (fibronectines, collagène de type IV et les protéoglycans) (186, 188). Les MMP de type membranaire (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, MMP-17 et MMP-25) activent pro-MMP-2 et pro-MMP-13 et elles digèrent la matrice extracellulaire (fibronectines, laminines et protéoglycans) (186, 188).

Finalement, il y a les MMP qui ne sont pas classifiées tel que MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23 et MMP-28 (186). Chacune de ces protéines possède un rôle différent (186), par exemple, MMP-12 est une élastase, donc elle permet la dégradation de l'élastine (189). MMP-20 digère l'amélogénine, une protéine qui se trouve dans l'émail (186).

Les différentes MMP se trouvent dans différents types cellulaires, par exemple, MMP-25 est exprimée dans les leucocytes, MMP-12 se trouve dans les macrophages alors que MMP-19 se trouve dans les cellules hépatiques (186). Les molécules responsables de l'activation des MMP sont principalement la furine et la plasmine. En effet, la plasmine active proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 et proMMP-13 (186, 188). Pour les MMP clivées par la furine tel que proMMP-11, proMMP-14, proMMP-15, proMMP-16, proMMP-17, proMMP-24 et proMMP-25, celles-ci possèdent la séquence de clivage de la furine soit $KX_n(R/K)R$ (186, 188). La proMMP-11 est activée par la furine dans l'appareil de Golgi avant d'être sécrétée sous forme active dans le milieu extracellulaire (186). Certaines proMMP tel que proMMP-9 et proMMP-2 sont activées par d'autres MMP actives.

Les MMP vont cliver à des sites $PXX\downarrow X_{Hy}$ où X_{Hy} est un résidu hydrophobique et P est Proline. Pour MMP-2, sa sélectivité est plus importante pour $L/IXX\downarrow X_{Hy}$ ou $HXX\downarrow X_{Hy}$ où L est leucine, I est isoleucine et H est l'histidine (191).

1.4.2.2 Les inhibiteurs des métalloprotéases : TIMP

Les inhibiteurs des métalloprotéases de la matrice sont des protéines dont le poids moléculaire varie entre 21-30 kDa qui sont appelées les *Tissus inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) (184). Il y a quatre molécules homologues qui sont TIMP1, TIMP2, TIMP3 et TIMP4 (186). TIMP1 inhibe MMP-1, MMP-7, MMP-9, MMP-19 et ADAM10 (192). Il est synthétisé par les cellules du tissu conjonctif tel que les macrophages (184). Chez les patients avec un haut niveau de LDL oxydé, la production de TIMP1 est diminuée dans les macrophages alors que les niveaux de TIMP1 sont augmentés dans la plaque athérosclérotique (184). Cette diminution dans les macrophages est aussi

accompagnée d'une augmentation de MMP-9, ce qui pourrait favoriser la dégradation de la matrice et la rupture de la plaque athérosclérotique. En ce qui concerne TIMP2, il y aurait une corrélation entre son expression et l'inhibition de la protéolyse de la matrice extracellulaire en inhibant MMP-14 (193). TIMP3 est localisée dans la matrice extracellulaire (184). Elle est efficace pour inhiber le clivage de l'ectodomaine de plusieurs protéines tel que la L-sélectine et le CD30 tout comme ADAM10, ADAM12 et ADAM17 (192). TIMP4, est la principale TIMP dans le cœur et elle joue un rôle important dans l'infarctus du myocarde, les arrêts cardiaques et cardiomyopathies. En effet, TIMP4 permet le remodelage cardiaque après un infarctus du myocarde en induisant la différenciation des cellules progénitrices en cardiomyocytes (194).

Parmi les métalloprotéases inhibée par les TIMPs, il y a les adamalysines telles que ADAM10, ADAM12 et ADAM17 (60). Parmi la famille des adamalysines, ADAM10 et ADAM17 sont les protéines les plus fréquemment responsables du clivage de l'ectodomaine des protéines transmembranaires (192). Chez les souris *Adam17^{-/-}*, le facteur de nécrose tumoral, la L-sélectine et la protéine précurseur de l'amyloïde ne sont pas relâchées dans le milieu environnant (195), car le clivage de l'ectodomaine n'a pas lieu. ADAM10 est impliquée dans la relâche de plusieurs protéines incluant la protéine précurseur de l'amyloïde (195).

Chapitre 2 : Objectif du mémoire

Problématique 1 : Des études ont montré que GLG1 est clivée (148) et que deux fragments extracellulaires de 150 kDa et de 55 kDa sont générés. Cependant, les enzymes responsables de son clivage ne sont pas confirmées par des études plus précises et poussées. De plus, GLG1 joue un rôle dans l'athérosclérose et semble réguler le métabolisme des lipides (section 1.3.2.2). Sachant cela, nous avons décidé d'étudier l'effet du clivage de GLG1 en lien avec son rôle dans le métabolisme des lipides.

Hypothèse : GLG1 est clivée par des protéases à sérine et cela modifie sa fonction sur la sécrétion de l'apolipoprotéine B et le métabolisme des lipides.

Objectif 1 : Identifier les enzymes responsables de la protéolyse de GLG1

Objectif 2 : Identifier l'effet du clivage sur la fonction de la glycoprotéine dans le métabolisme des lipides.

Problématique 2 : Une étude menée par nos collaborateurs montre que les souris qui n'expriment plus GLG1 ont des adipocytes de plus petite taille et qui sont plus nombreux que ceux des souris de type sauvage. Une autre étude a montré que les souris hétérozygotes pour GLG1 ont une taille et un poids plus petit que les souris de type sauvage (159). De plus, GLG1 interagit avec Pref-1, un inhibiteur de l'adipogénèse, et les deux protéines auraient des fonctions opposées. Nous avons donc voulu caractériser le rôle de GLG1 durant la différenciation des adipocytes.

Hypothèse

- 1a. L'expression de GLG1 varie au cours de l'adipogénèse.
- 1b. L'absence de GLG1 affectera le processus d'adipogénèse

Objectif 1 : Caractériser l'expression de GLG1 durant la différenciation des fibroblastes murins en adipocytes.

Objectif 2 : Caractériser l'effet de l'absence de GLG1 sur la différenciation des fibroblastes murins en adipocytes.

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

3.1. Construction des plasmides d'expression

3.1.1 GLG1

Une réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été effectuée pour amplifier mGLG1 (Open Biosystem clone #5296427) qui a été clonée dans le vecteur pcDNA3.0. L'épitope HA (YPYDVPDYA) dérivé de la glycoprotéine *Human influenza hemagglutinin* a été ajouté au vecteur de pcDNA3.0-mGLG1. L'épitope a été ajouté après le peptide signal de GLG1 à l'aide d'un chevauchement de la première PCR et de la deuxième PCR (Tableau I, Annexe 1). Les deux PCR ont été purifiées sur gel d'agarose (Solution 1, Annexe 2) et les deux fragments purifiés ont été utilisés pour effectuer une troisième PCR (PCR3, Tableau I, Annexe 1). La troisième PCR a été digérée par les enzymes EcoR1/Sbf1 (Tableau II, Annexe 1) pour ensuite être liée aux sites de restriction de ces enzymes du vecteur pcDNA3.0-mGLG1 pour obtenir le plasmide pcDNA3.0-mGLG1-HA. Les clones positifs exprimant le plasmide ont été amplifiés en transformant des bactéries Stbl3™ par électroporation et les constructions ont été validées par séquençage de l'ADN (Samami *et al.*, en préparation).

3.1.1.1 Mutations

Pour trouver les acides aminés situés aux sites de clivage de GLG1, nous avons muté les acides aminés basiques aux positions R423-R424, R453-K454 et R606-R607 par des alanines (A). Les PCR ont été effectués avec l'enzyme KAPA HiFi HotStart (Roche #07958889001). Pour commencer, deux PCR ont été effectués avec 50 ng du vecteur pcDNA3.0-mGLG1-HA afin d'amplifier deux fragments qui ont les segments avec les acides aminés mutés. Ensuite, les amplicons des PCR ont été mis sur gel de 1% d'agarose (Solution 1, Annexe 2) et les bandes d'intérêt ont été coupées et purifiées. Par la suite, la troisième PCR a été effectuée avec le chevauchement de la première PCR et de la deuxième PCR et chargée sur gel d'agarose de 1% et purifiée. La troisième PCR purifiée et 5 µg du vecteur pcDNA3.0-mGLG1-HA ont été digérés pendant 16h à 37°C avec les enzymes

SacII et AgeI-HF (Tableau II, Annexe 1), purifiés et leurs concentrations mesurées sur gel d'agarose 1% et par spectrophotométrie avec le NanoDrop® (ND-1000) respectivement. Le vecteur digéré et l'insert ont été liés ensemble selon le protocole décrit plus bas (section 3.2). Les mutations ont été confirmées par séquençage. Les amorces pour chaque mutation se trouvent en annexe (Tableau XIII, Annexe 1).

3.1.2 PCSK

La construction des plasmides pIRES2-EGFP, pIRES2-EGFP-V5 contenant l'épitope V5 (GKPIPPLLGLDST) en C-terminal et pIRES2-EGFP-hPCSK9-V5 a été décrite auparavant dans l'article de Demers *et al.* (196). Une PCR a été effectuée sur PCSK5A (pDONR221-hPC5, DF/HCC DNA Resource Core, Harvard Medical School), Furine (pENTR223-Furin, DF/HCC DNA Resource Core, Harvard Medical School), SKI-1 humain (MBTPS1, Open Biosystems, clone #IB40054074) et PCSK6 humain et les inserts ont été digérés et liés au vecteur pIRES2-EGFP-V5 aux sites NheI/AgeI (Tableau II, Annexe 1). Finalement, pour pIRES2-EGFP-hPCSK7-V5 l'épitope V5 a été ajouté en C-terminal de PCSK7 humain (Open Biosystem clone #ID 3868257), avant d'être cloné aux sites de restriction NheI/AgeI (Tableau II, Annexe 1) du vecteur pIRES2-EGFP. Les constructions ont été validées par séquençage de l'ADN (196, 197).

3.1.3 pU6-shGLG1, pAAV-mGLG1-HA et pZAC2.1-mGLG1-HA

L'ADN complémentaire formé d'un seul brin (sscDNA) du contrôle ou de mGLG1 (Tableau XV, Annexe 1) contient différents petits ARN en épingle à cheveux (shRNA) (Integrated DNA Technologies). Les shRNA étaient entourés de sites de restriction pour HindIII et BamHI (Tableau II, Annexe 1). Pour générer le shRNA recombiné contre mGLG1 (shGLG1) et le contrôle (shCTL), les sscDNA ont été amplifiés par PCR. Les amplicons doubles brins ont été digérés par HindIII et BamHI (Tableau II, Annexe 1), purifiés tel que décrit dans la section 3.2, et liés dans le vecteur pU6 ITR (donné gracieusement par Dr N. Boussette de l'Institut de cardiologie de Montréal (ICM)) (Ardo *et al.*, en préparation). Le plasmide pAAV-D377Y-mPCSK9 a été acheté chez Addgene

(Plasmide #58376). Ce plasmide a été utilisé pour produire un pAAV-vidé et pAAV-mGLG1-HA. Le plasmide pAAV-D377-mPCSK9 et le plasmide pcDNA3.0-mGLG1-HA ont été digérés avec FseI et EcoRI-HF (Tableau II, Annexe 1) à 37°C pendant 1h. Les produits de la digestion ont été mis sur gel d'agarose de 0,8% (Solution 2, Annexe 1), purifiés selon le protocole d'extraction par gel de QIAGEN (#28706) (fragments codant pour mGLG1-HA et pAAV) et liés selon le protocole de ligation (section 3.2). Pour la création du plasmide de pZAC2.1-mGLG1-HA, le vecteur vide pZAC2.1 et le plasmide de pcDNA3.0-mGLG1-HA ont été digérés avec EcoRI et XbaI (Tableau II, Annexe 1) pendant toute la nuit à 37°C. Les fragments d'intérêts ont été chargés sur gel d'agarose de 0,8% et purifiés. Après la purification, le vecteur et l'insert ont subi une ligation suivie d'une purification selon le protocole décrit plus bas (section 3.2). Les bactéries Stb13™ ont été transformées avec les produits de ligation et les clones positifs ont été confirmés par séquençage.

3.2 Ligation et purification

Le vecteur digéré (PCDNA3.0 ou pIRES2 ou pAAV ou pZAC2.1) et l'insert (mGLG1-HA ou PCSK5, PCSK6, PCSK7, SKI-1, PCSK9, Furine) ont été liés pour obtenir le vecteur exprimant la protéine d'intérêt. Un ratio d'insert et de vecteur à 3 :1 a été utilisé et le volume complété avec de l'eau jusqu'à 10 µL. La solution a été incubé à 37°C pendant 3 minutes. Ensuite, 10 µL de tampon de la *quick ligase* (2X Quick Ligase Reaction Buffer, New England Biolabs #B2200S) ont été ajoutés ainsi que 1 µL de l'enzyme *Quick Ligase* (New England Biolabs #M2200S). Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 minutes et mis sur glace avant d'être purifié pour obtenir l'ADN circulaire composé du vecteur lié à l'insert. Pour purifier le produit de ligation, les 20 µL de la réaction de ligation ont été ajoutés à 80 µL de tampon Tris 10 mM pH 8,0 (BioShop #TRS001.5). Le mélange a été complété avec 100 µL de phénol pH8 :Chloroforme :isoamyl alcool (25 :24 :1) (Fisher Scientific #BP1753) qui va permettre la séparation des phases pour pouvoir recueillir la phase avec l'ADN. Les tubes ont été centrifugés à 12 000xg à 4°C pendant 5 minutes. La phase du dessus a été recueillie dans un nouveau tube et 400 µL d'éthanol 100% froid ont été ajoutés avec 25 µL d'acétate

d'ammonium 10 M (Fisher Chemical #A639) et 1 μ L de glycogène 20 mg/mL (Invitrogen ultraPure #10814-010). Le tout a été centrifugé à 12 000 xg à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant a été jeté et le culot d'ADN a été lavé avec 300 μ L d'éthanol 75% froid. Les tubes ont été centrifugés de nouveau à 12 000 xg à 4°C pendant 5 minutes et le surnageant a été jeté. Les culots ont ensuite été séchés avec le *Speed Vac concentrators* (Savant #sc110) pendant 15 minutes et resuspendus dans 5 μ L d'eau nanopure.

3.3. Transformation bactérienne et isolation du plasmide

3.3.1 DH5 α TM

Pour les transformations bactériennes avec un ADN circulaire (pcDNA3.0-mGLG1-HA, pIRES2-EGFP-hPCSK9-V5, pIRES2-EGFP-hPCSK5-V5, pIRES2-EGFP-hPCSK6-V5, pIRES2-EGFP-hPCSK7-V5, pIRES2-EGFP-hSKI-1-V5, pIRES2-EGFP-hfurine-V5), les bactéries utilisées ont été les DH5 α TM (Invitrogen #18265-017). Après la décongélation sur glace des bactéries, 1 μ L de l'ADN circulaire a été ajouté aux bactéries. Elles ont été incubées 30 minutes sur glace, suivi d'un choc thermique de 45 secondes à 42°C. Ce choc a provoqué la formation de pores dans la paroi cellulaire, ce qui a permis l'entrée de l'ADN exogène. Après le choc thermique, les bactéries ont été remises sur glace pour 2 minutes et 600 μ L de SOC stérile (Solution 5, Annexe 2) ont été ajoutés au mélange. Les tubes ont été mis dans l'incubateur (Thermo Scientific #4350) à 37°C sous agitation à 250 rpm pour 30 minutes. Un gel contenant 25 mL de DYT-Agar stérile (Solution 6, Annexe 2) contenant 1 μ g/mL d'antibiotique dont le gène de résistance est exprimé par le plasmide a été coulé dans un pétri de 100 mm. Pour les protéines exprimées dans un vecteur pcDNA 3.0, pAAV et pZAC, l'antibiotique était l'ampicilline (Fisher Scientific #BP1760). En ce qui concerne les protéines exprimées dans un vecteur pIRES, l'antibiotique était la kanamycine (WISSENT INC, #400-145). Après l'incubation, 55 μ L de bactéries ont été étalés sur le pétri. Le pétri été mis dans l'incubateur (SHEL-LAB #1535) à 37°C pendant 16h. Après les 16h d'incubation, les clones qui avaient poussé ont été mis dans 2 mL de bouillon de culture formé de DYT stérile (Solution 7, Annexe 2) avec 1 μ g/mL d'antibiotique. Par la suite, les bouillons ont été remis dans l'incubateur à 37°C sous agitation à 250 rpm pour 7h. Ensuite, 200 μ L de bactéries provenant du bouillon ont été

mis dans des erlenmeyers contenant 200 mL de DYT stérile (Solution 7, Annexe 2) avec 1 µg/mL d'antibiotique et les bouillons ont été remis dans l'incubateur à 37°C sous agitation à 250 rpm pour 16h. L'isolation du plasmide a été effectuée selon le protocole fourni avec le kit NucleoBond® PC 500 (Macherey-Nagel #740574). La concentration et la pureté du plasmide ont été mesurées par spectrophotométrie au NanoDrop® (ND-1000) et le tube contenant le plasmide a été placé à -20°C.

3.3.2 Stbl3™

Afin d'éviter la recombinaison des plasmides pU6-shGLG1, pAAV-mGLG1-HA et pZAC2.1-mGLG1-HA avec l'ADN bactérien, les bactéries électrocompétentes Stbl3™ ont été utilisées (données gracieusement par le laboratoire de G. Lettre de l'ICM). Pour l'électroporation. Un aliquot contenant 40 µL de bactéries a été décongelé sur glace. Après la décongélation, 1 µL de l'ADN purifié provenant de la ligation a été ajouté aux bactéries. Le volume total a été transféré dans une cuvette d'électroporation de 1 mm. La cuvette a été placée dans l'électroporateur (*BTX electroporation system*) et soumise à une électroporation d'une durée de 4 à 4,2 msec (un mode T à 2.5KV, une résistance R à 129' Ω et à une tension de charge S à 1,5 kV), suivi d'un ajout de 960 µL de SOC stérile (Solution 5, Annexe 2). Les bactéries dans le SOC ont été transférées dans un tube de 1,5 mL et incubées à 37°C à 250 rpm pendant 1h. Après incubation, 1/10 du volume total a été étalé sur un pétri de 100 mm de DYT-Agar avec 1 µg/mL d'antibiotique. Le pétri a été incubé pour 16h à 37°C. La croissance bactérienne et l'isolation du plasmide ont été effectuées tel que décrit plus haut avec les DH5α™ (section 3.3.1). Tous les plasmides ont été séquencés après chacun des clonages.

3.4 Culture cellulaire

3.4.1 HEK 293T

Les cellules HEK 293T (ATCC® CRL-3216™) sont des cellules rénales embryonnaires humaines. Ces cellules ont été gardées en culture à 37 °C avec 5% de CO₂ dans du

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 015, WISENT #319-015-CL,) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé (FBS HI, WISENT #80150). Les HEK 293T ont été passées deux fois par semaine dans une flasque de 75 cm² (T75). Les cellules ont été utilisées en deçà de 30 passages pour toutes les expériences.

3.4.2 3T3-L1

Les cellules 3T3-L1 (ATCC® CL-173™) ont été offertes gracieusement par le laboratoire du Dr F. Tanguay de l'ICM. Ce sont des fibroblastes de souris. Les cellules ont été gardées en culture dans du *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM 005, WISENT 319-005-CL) additionné de 10% de sérum de veau (milieu complet, CS, WISENT #74250) à 37°C et 5% de CO₂. Les fibroblastes perdent leur capacité de différenciation après 13 passages ou s'ils atteignent une confluence de 100%. Ces cellules adhérentes nécessitent l'utilisation de la trypsine pour leur passage. Elles ont été lavées avec 10 mL de tampon phosphate salin (PBS, WISENT #311-010-CL), puis incubées avec de la trypsine 0,25% /EDTA 2,21 mM (WISENT #325-043-EL) à 37°C pour cinq minutes. Par la suite, la trypsine a été neutralisée par l'ajout de milieu complet et les cellules ont été ensemencées dans une nouvelle flasque.

3.5. Transfection

3.5.1 GLG1 et PCSK

Le vecteur vide pIRES2-EGFP, dans lequel chaque PCSK a été sous-clonée a été utilisé comme contrôle. Au jour 0, les cellules HEK293T ont été divisées pour obtenir 400 000 cellules par puits de 35 mm (9,6 cm²) et ont été incubées pour 24h à 37°C et 5% CO₂. Au jour 1, 100 µL de DMEM 015 sans sérum ont été mélangés avec 1 µg de pcDNA3.0-mGLG1-HA, 1 µg du plasmide de chaque PCSK respectivement et avec 8 µL de polyéthylèneimine 1 mg/mL (PEI, Polysciences, INC #23966-1). Après avoir été mélangés en les vortexant, les tubes ont été incubés pour 10 minutes à température ambiante. Par la suite, chaque mélange a été ajouté à un puits pour être incubé pour 7h à 37°C et 5% CO₂. Après 7h, le milieu a été changé avec 2 mL DMEM 015 + 10 % FBS. Au

jour 2, 30h après la transfection, le milieu a été changé avec 1 mL de DMEM 015 sans sérum pour 24h. Au jour 3, les milieux ont été récoltés et les cellules ont été lysées selon le protocole décrit plus bas (section 3.9). L'analyse des milieux et des cellules s'est faite par immunobuvardage à la Western (section 3.9).

3.5.2 GLG1 et TIMP

GLG1 a été transfectée dans des cellules HEK 293T en présence de chacun des *Tissus inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) (GenScript), soit les plasmides pcDNA3.0-TIMP1-DYK, pcDNA3.0-TIMP2-DYK, pcDNA3.0-TIMP3-DYK ou pcDNA3.0-TIMP4-DYK (Tableau V, Annexe 1) selon les mêmes étapes que lorsque GLG1 a été co-transfectée avec les PCSK, soit avec 1 µg de pcDNA3.0-mGLG1-HA et 1 µg de chaque TIMP. Puisque les TIMPs sont exprimées dans un vecteur pcDNA3.0, le puits contrôle a été transfecté avec 1 µg de pcDNA3.0-vide et 1 µg de pcDNA3.0-mGLG1-HA.

3.6 Inhibiteurs

Pour tester chaque inhibiteur, soit l'inhibiteur des PCSK, les inhibiteurs des MMP et les inhibiteurs des protéases à sérine (Tableau III/IV, Annexe 1) différentes concentrations ont été utilisées. Les cellules HEK 293T ont été mises en plaque de 6 puits (9,6 cm²/puits) et transfectées avec 2 µg pcDNA3.0-mGLG1-HA tel que décrit dans la section 3.5.1. et les inhibiteurs ont été ajoutés à différentes concentrations 30 h post-transfection. Les milieux ont été récoltés 16h après l'ajout du milieu avec l'inhibiteur et les cellules lysées selon la démarche décrite dans la section 3.9. L'analyse des milieux et des cellules a été effectuée par immunobuvardage à la Western (148, 198).

3.7 Déglycosylation

La taille des fragments de GLG1 a été analysée après la déglycosylation de la protéine. Les cellules HEK293T ont été transfectées avec pcDNA3.0-mGLG1-HA et après 48h, 20 µg de milieu contenant GLG1 secrétée et 20 µg d'extrait cellulaire ont été prélevés. La déglycosylation de ces échantillons été effectuée selon le protocole de la PNGase F de

New England Biolabs (NEB #P0704S) qui est une amidase qui permet de cliver entre les résidus d'asparagine et N-Acetylglucosamine qui ont une forte concentration en mannose et en oligosaccharides. En effet, 20 µg de protéines des milieux et des extraits cellulaires ont été mélangées avec 1 µL de *Glycoprotein denaturing buffer* 10X et de l'eau (complété avec l'eau jusqu'à 10 µL). Le mélange a été incubé à 100°C pendant 10 minutes pour permettre la dénaturation de GLG1. Par la suite, 2 µL de *GlycoBuffer 2* (10X), 2 µL de *NP-40*, 1 µL de PNGase F et de l'eau (complété à 20 µL) ont été ajoutés au mélange contenant GLG1. La réaction a été ensuite incubée à 37°C pendant 1h. En parallèle, les mêmes échantillons ont été soumis à des conditions d'incubation identiques (tampons/températures) en absence de l'enzyme PNGase F pour avoir des contrôles sans déglycosylation. L'analyse de la taille des protéines déglycosylées a été effectuée par immunobuvardage à la Western telle que décrite plus bas dans la section 3.9.

3.8 Réduction de l'expression d'ADAM17 à l'aide d'un siRNA

Les petits ARN interférents (siRNA) contre ADAM 17 soit ON-TARGETplus SMARTpool Human ADAM17 (siADAM17, Dharmacon, L-003453-00-0005) (Tableau VII, Annexe 1) tout comme le siGENOME control pool (siCTL, Dharmacon D-001206-14-20) ont été dilués avec de l'eau stérile à 20 µM (Tableau IX, Annexe 1). Au jour 0, dans une plaque de 12 puits (3,5 cm²/puits), 100 µL d'opti-MEM (GIBCO #31985-062) ont été ajoutés. Par la suite, 60 nM de siCTL ou de siADAM17 ont été ajoutés. Dans chaque puits, 1,5 µL de lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen #13778-075) a été ajouté au mélange qui a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Après l'incubation, 500 µL de HEK 293T soit 40 000 cellules dans du DMEM 015 +10% FBS ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées à 37°C et 5 % CO₂ pour 16h. Au jour 1, 1 µg de pcDNA3.0-mGLG1-HA a été transfecté dans les cellules de deux puits soit un de siCTL et un de siADAM17 selon la section 3.5.1. Pour les deux jours suivants, l'incubation et le changement de milieu ont été effectués selon les étapes décrites dans la section 3.5.1. (183, 214). L'analyse des milieux et des cellules a été effectuée par immunobuvardage à la Western. Pour pouvoir quantifier l'expression de l'ARN messager d'ADAM17 par qPCR, deux puits contrôles avec le

siADAM17 n'ont pas été transfectés avec mGLG1-HA. Pour les deux puits qui n'ont pas été transfectés avec mGLG1-HA, le milieu a été jeté et 1 mL de riboZol™ (VWR Life sciences #N580) a été ajouté afin de procéder à l'extraction d'ARN (section 3.10).

3.9 Immunobuvardage à la Western

Les milieux récoltés des cellules transfectées ont été centrifugés à 1500 rpm pour 5 minutes à 4°C. Après la centrifugation, chaque surnageant a été récolté. En ce qui concerne les cellules, celles-ci ont été lavées deux fois avec du PBS et lysées avec 500 µL de RIPA 1X (Solution 9, Annexe 2). Les extraits cellulaires ont été mis en rotation pendant 30 minutes à 4°C et centrifugés à 14 000xg pendant 15 minutes à 4°C. Après la centrifugation, le surnageant a été récolté. Les protéines ont été dosées avec un dosage colorimétrique de Bradford. Pour chaque échantillon de 25 µg de milieu ou de lysat cellulaire a été mélangé avec du tampon Laemmli 6X (Solution 10, Annexe 2). Le rôle du tampon Laemmli est très important, car il permet de créer des conditions optimales pour que les protéines se séparent selon leur taille. En effet, le dodécylsulfate de sodium (SDS) contenu dans le tampon Laemmli est un détergent qui dénature les protéines et permet la linéarisation de ces protéines. Les protéines migrent alors proportionnellement à leur taille. Le mélange a été chauffé à 95°C pendant cinq minutes pour dénaturer les protéines en présence du Dithiothréitol (DTT) qui est contenu dans le tampon Laemmli et qui empêche la formation de ponts disulfures. Les échantillons préparés ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE. Le gel était formé de deux parties soit le gel concentration de 4 % (Solution 14, Annexe 2) en haut et un gel de séparation en bas (Solution 12/13, Annexe 2). La concentration du gel de séparation était 8% ou 15% d'acrylamide 30% (BIO-RAD #161056) selon les protéines d'intérêts chargées sur le gel. La migration des protéines sur le gel a été effectuée dans le tampon de migration 1X (Solution 15, Annexe 2) à 200 V pendant 1h et a été suivie d'un transfert des protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm (BIO-RAD #1620112). Le transfert a eu lieu dans le tampon de transfert 1X (Solution 17, Annexe 2) pendant 16h à 33V. Après le transfert, les membranes ont été colorées au ponceau rouge (Solution 18, Annexe 2) pendant trois minutes puis lavées avec de l'eau distillée. Cette étape a permis de visualiser l'efficacité et l'uniformité

du transfert. La membrane a été bloquée pendant 1h avec du lait en poudre écrémé à 5% dilué dans du TTBS 1X (Solution 20, Annexe 2). Cette étape a permis d'éviter les liaisons non spécifiques des anticorps. Après 1h d'incubation sous agitation, les anticorps primaires dilués dans du lait 1% ont été incubés sur les membranes (Tableau X, Annexe 1) pour 16 h à 4°C. Les membranes ont ensuite été lavées quatre fois 10 minutes avec du TTBS 1X (Solution 20, Annexe 2), puis ont été incubées en présence des anticorps secondaires (Tableau XI, Annexe 1) pendant 1h à température ambiante et sous agitation. Les membranes ont par la suite été lavées avec du TTBS 1X quatre fois pendant 10 minutes, puis révélées par chimiluminescence avec le *Western Lightning Plus ECL* (PerkinElmer #ORT2655 et #ORT2755) selon les instructions du fabricant lors duquel le signal est visualisé sur film sensible aux rayons X (Mandel Scientific Company, INC #B4200 F2) (84,85).

Pour détecter GLG1-HA, un anticorps anti-HA (Tableau X, Annexe 1) a été utilisé pour les milieux et pour les lysats de cellules. Pour détecter les PCSK dans les extraits cellulaires, un anti-V5-HRP a été utilisé (Tableau X, Annexe 1). De plus, l'anti-actine (Tableau X, Annexe 1) a été utilisé comme contrôle de chargement sur le gel pour les membranes avec les extraits cellulaires. Pour les anticorps secondaires, l'anti-*rabbit* (Tableau XI, Annexe 1) a été utilisé pour les membranes avec l'anti-HA et l'anti-actine alors que l'anti-HRP-V5 n'avait pas besoin de d'anticorps secondaire, car l'anticorps primaire était déjà couplé à une peroxydase de raifort (HRP).

Pour détecter les TIMPs dans les extraits cellulaires, les anticorps utilisés étaient anti-DDK pour TIMP1, anti-TIMP2, anti-TIMP3 et anti-TIMP4 (Tableau X, Annexe 1). Il est important de noter que toutes les TIMPs avaient l'épitope DYK (aussi connu sous le nom de DDK), cependant, la détection avec l'anticorps de DDK ne s'était pas avérée efficace et seulement le plasmide pcDNA3.1-hTIMP1-DYK a été détecté dans les extraits cellulaires avec l'anti-DDK. Pour les anticorps secondaires, l'anti-*rabbit* (Tableau XI, Annexe 1) a été utilisé pour les membranes avec anti-TIMP2, anti-TIMP3 et anti-TIMP4 alors que pour l'anti-DDK, l'anticorps secondaire était l'anti-*mouse* (Tableau XI, Annexe 1).

3.10 Extraction d'ARN, RT-PCR et qPCR

Les échantillons cellulaires conservés à -80°C dans le riboZol™ (VWR Life sciences #N580) ont été décongelés et incubés pour 10 minutes à température ambiante. Dans chaque tube, l'ajout de 200 μL chloroforme (Anachemia #2310-360) était important pour permettre la séparation de la phase organique qui va contenir les protéines, de l'interphase qui va contenir l'ADN et de la phase aqueuse qui va contenir l'ARN. Après un mélange vigoureux et une incubation de trois minutes, les tubes ont été centrifugés à 4°C pour 15 minutes à 12 000xg. Par la suite, 80% de la phase aqueuse a été récolté. Cette phase aqueuse a été mélangée avec 500 μL d'isopropanol (Fisher Chemicals # A451-1) et le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante. L'isopropanol permettant de précipiter l'ARN, nous avons obtenu un culot après une centrifugation à 4°C pour 10 minutes à 12 000xg. Le surnageant contenant les déchets et contaminants a été jeté et le culot a été lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % et centrifugé de nouveau à 4°C pour 5 minutes à 7 500xg. Par la suite, l'éthanol a été enlevé et le culot a été séché pendant 7 minutes. Le culot a ensuite été dissout dans de l'eau stérile sans DNase, RNase et protéases (WISSENT INC #809-115-CL) et les tubes ont été incubés à 60°C pour 10 minutes. Après l'incubation, les tubes ont été mis sur glace et la pureté et la concentration de l'ARN ont été mesurées avec le spectrophotomètre (NanoDrop ND-1000). L'intégrité de l'ARN a été vérifiée sur un gel d'agarose de 1% (WISSENT INC #800-015-CG) (Solution 1, Annexe2) en utilisant 5 μL d'échantillon additionnés de 1 μL du 6X *gel loading dye* (New England BioLabs #B7024S) et une migration a lieu à 80V pour éviter de dégrader les échantillons. Une PCR avec une transcriptase inverse (RT-PCR) a été effectuée pour obtenir l'ADN complémentaire de chaque échantillon. Pour se faire, 250 ng de chaque échantillon ont été ajoutés à 4 μL de *5x iScript Reaction Mix* et 1 μL de *iScript Reverse Transcriptase* (BIO-RAD #1708891) et le mélange a été complété jusqu'à 20 μL avec de l'eau stérile. Le mélange a été incubé dans un thermocycleur pour trois étapes (amorçage, transcription inversée (*reverse transcription*) et inactivation de la *reverse transcription*) soit 5 minutes à 25°C suivi de 20 minutes à 46°C puis d'une minute à 95°C . Les échantillons d'ADN complémentaire ont par la suite été utilisés pour mesurer

l'expression des différents gènes avec une PCR en temps réel (qPCR). Chaque échantillon a été dilué à 25 ng puis 3 µL de chaque dilution ont été mélangés à 1 µL de chacune des amorces sens (*forward*, f) et anti-sens (*reverse*, r) à 3µM et 5 µL de iTaq Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD #1725121). La qPCR en temps réel a été effectuée dans un cycleur Mx3000P (5 secondes à 95°C suivi de 30 secondes à 60°C pour 40 cycles suivi par une courbe de dénaturation). Les séquences des amorces sont dans le Tableau XII, Annexe 1 où les amorces de souris sont pour les échantillons provenant de la différenciation des fibroblastes en adipocytes. Le niveau d'expression des gènes a été normalisé sur la *TATA binding protein* (h/mTBP) et la *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase* (h/mHPRT) (196).

3.11 Préparation des virus AAV8

Les cellules HEK 293T ont été amplifiées afin d'obtenir six pétris de 150 mm (148 cm²) qui ont chacun été transfectés avec 7,66 µg de plasmide d'intérêt (pAAV-vide, pAAV-mGLG1-HA, pZAC2.1-mGLG1-HA, pU6-shCTL ou pU6-shGLG1), 23 µg de pDG8, un plasmide « *helper* » donné gracieusement par Dr N. Boussette de l'ICM (227) et 122,67 µL de PEI dilué dans 1,54 mL de DMEM 015 sans sérum. Les cellules ont été incubées pendant 7h et le milieu a été changé pour du milieu complet pour 72h. Les cellules ont été récoltées dans 5 mL de DMEM 015 à l'aide d'un grattoir. Le culot de cellules obtenu par centrifugation à 1140xg pendant 10 minutes a été resuspendu dans le tampon de lyse (Solution 21, Annexe 2), puis soumis à trois gels/dégels dans de l'azote liquide et un bain d'eau à 37°C respectivement. Après les gels/dégels, le lysat a été incubé à 37 °C en présence de 1 µL/mL de MgCl₂ 1M (Sigma #M8266) et de 250 unités/mL de Benzonase nucleases (Santa Cruz #sc-202391) pendant 45 minutes en agitant à chaque 15 minutes. Le lysat a été centrifugé à 4500xg pendant 30 minutes afin de prélever le surnageant contenant les particules virales. Pour la centrifugation différentielle, dans trois tubes de 5 mL d'ultracentrifugation (Beckman Coulter #344057), le gradient d'iodoxanol (Solution 25, Annexe 2) a été préparé et 1,5 mL de surnageant a été ajouté dans chaque tube. Le gradient avec le virus a été mis dans l'ultracentrifugeuse (Beckman Optima™ LE-80K ultracentrifuge) pendant 3h à 33 000 rpm et 4°C. Après la centrifugation, les adénovirus

associés 8 (AAV8) ont été récoltés en piquant les tubes à l'interphase entre l'iodoxanol 60% et 40% avec des aiguilles 18G11/2. Les AAV8 ainsi récoltés ont été dilués avec un volume de solution de lavage (Solution 27, Annexe 2) au moins 3 fois supérieur à celui récolté. Le virus a ensuite été lavé en utilisant des tubes de concentration (Amicon ultra-15 #UFC910024). Pour le lavage, 10 mL de la solution de lavage ont été ajoutés et centrifugés à 1500xg jusqu'à ce qu'il reste 1 mL dans le filtre. La solution de lavage a été jetée. Cette étape a été recommencée trois fois. Après le dernier lavage, tout ce qui se trouve dans le filtre a été récolté et conservé à 4°C. Les virus (AAV8-mGLG1-HA, AAV8-vide, AAV8-pZAC2.1-mGLG1-HA, AAV8-pU6-shCTL ou AAV8-pU6-shGLG1) ont été titrés par qPCR avec les amorces de pAAV, de pZAC ou de BGH (Tableau XII, Annexe 1) (199).

Tableau 4 : Concentrations des virus AAV8

Plasmide	Concentration (Génome copie/ μL)
pAAV-vide	8,9E+08
pAAV-mGLG1-HA	1,0E+09
pZAC2.1-mGLG1-HA	2,8E+07
pU6-shCTL	1,0E+11
pU6-shGLG1	4,8E+09

3.12 Injection des souris et analyse

Notre étude a été approuvée par le Comité d'éthique animal de l'Institut de cardiologie de Montréal. Les souris C57BL/6 âgées de huit semaines (Charles River Laboratories, Saint-Constant, Qc, Canada) ont été hébergées une par cage dans les conditions requises de température (23°C) et d'humidité (50%), et soumises à un cycle de 12h lumière/noirceur avec libre accès à un régime alimentaire normal et à l'eau. Trois groupes de trois souris C57BL/6 âgées de 10 semaines ont reçu un AAV8 via une injection intraveineuse (IV) dans la veine de la queue avec une dose de 1×10^{11} *Viral Genome* (VG)/souris (200) soit de AAV8-vide qui est le contrôle ou de AAV8-mGLG1-HA qui code pour la protéine d'intérêt à étudier. De plus, une souris a été injectée avec AAV8-pZAC2.1-mGLG1-HA (1×10^{11} VG/souris) pour pouvoir tester l'efficacité du vecteur

pZAC2.1 dans la surexpression de GLG1. Les souris injectées avec AAV8-pU6-shGLG1 et AAV8-pU6-shCTL ont reçu une dose de 3×10^{11} VG/souris (Ardo *et al.*, en préparation). Les volumes de solution virale et de la dilution dans la solution saline se trouvent dans le tableau 5, le volume total d'injection était de 200 μ L des virus AAV8-vide, AAV8-mGLG1-HA, AAV8-pZAC2.1-mGLG1-HA par souris et 150 μ L des virus AAV8-pU6-shGLG1 et AAV8-pU6-shCTL par souris.

Tableau 5: Volume d'injection de virus et de solution saline 0,9% pour chaque plasmide

Plasmide	Volume de virus (μ L)	Volume saline 0,9% (μ L)	Concentration VG/souris)
pAAV-vide	113	87	1×10^{11}
pAAV-mGLG1-HA	96	104	1×10^{11}
pZAC2.1-mGLG1-HA	Concentrer jusqu'à 200 μ L	0	1×10^{11}
pU6-shGLG1	63	87	3×10^{11}
pU6-shCTL	3	147	3×10^{11}

Au jour 0, avant l'injection par IV (jour 1), des prélèvements sanguins de 100 μ L ont été effectués via la veine mandibulaire et au jour 19, les souris ont été sacrifiées par ponction cardiaque où le sang et le foie ont été prélevés. Les échantillons de sang (J0 et J19) ont été centrifugés à 4°C à 1500xg pendant 15 minutes. Les plasmas ont ensuite été récupérés et conservés à -80°C. Pour les extraits de foie, 20 mg de tissu ont été broyés dans 600 μ L de RIPA 1X et lysés selon le protocole de lyse décrit plus haut. Les extraits de foies ont été mélangés avec du tampon Laemmli 2X et chargés sur gel pour faire un immunobuvardage à la Western. En ce qui concerne les extraits de plasma du jour 19, les protéines d'intérêt ont été isolées avec une immunoprécipitation (IP). La première IP a été faite avec les plasmas provenant de souris injectées avec AAV8-vide et AAV8-mGLG1-HA où 50 μ L de plasma ont été mélangés avec 450 μ L de RIPA 1X et 100 μ L de billes Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz biotechnologie #sc-2003) afin de procéder à un pré-nettoyage. Les échantillons ont été mis sous rotation à 4°C pendant 1h, puis ils ont été centrifugés à 2500 xg pendant 3 minutes à 4°C. Les surnageants ont été transférés dans des nouveaux tubes, 2 μ L de l'anticorps anti-HA et 50 μ L de billes Protein A/G PLUS-Agarose ont été ajoutés à chaque mélange. Les tubes ont été mis sous rotation à 4°C pour toute la

nuit afin de procéder à l'immunoprécipitation. Le lendemain, les tubes ont été centrifugés à 2500xg pendant une minute à 4°C et le surnageant a été jeté. Les billes ont ensuite été lavées quatre fois avec 500 µL de RIPA 1X. Après le dernier lavage, le surnageant a été jeté et 50 µL du tampon Laemmli 2X ont été ajoutés aux billes qui ont été chauffées à 95°C pendant 10 minutes. Les billes ont été centrifugées à 10 000xg pendant 5 minutes et le surnageant a été chargé sur gel pour faire un immunobuvardage à la Western. L'anticorps primaire utilisé est l'anti-HA et l'anticorps secondaire est le TrueBlot® anti-rabbit IgG (Tableau XI, Annexe 1). Dans les extraits de foies et les plasmas des souris AAV8-vidé et AAV8-mGLG1, l'expression protéique de ApoB48 et apoB100 a été analysée par immunobuvardage à la Western pour mesurer l'effet de la surexpression de GLG1 sur la sécrétion et l'expression de l'apoB48 et de l'apoB100 (Tableau X, Annexe 1) (200, 201).

3.13 Expression de GLG1 dans le plasma

Pour les souris injectées avec AAV8-pU6-shGLG1 et AAV8-pU6-shCTL, le sacrifice a été effectué à 90 jours après l'injection (Ardo *et al.*, en préparation).

Les plasmas de souris C57BL/6 shCTL ont été analysés par immunobuvardage à la Western avec l'anticorps anti-h/mGLG1 (R&D Systems # MAB 78791) (Tableau X, Annexe 1) et l'anticorps secondaire anti-mouse (Tableau XI, Annexe 1). Pour ce, 2 µL de plasma de chaque souris ont été dilués dans 28 µL d'eau, additionnés de tampon Laemmli 2X, chauffés à 95°C pendant 5 minutes et chargés sur un gel SDS-PAGE de 8% tel que décrit plus haut (section 3.9).

3.14 Différenciation des adipocytes

Les cellules 3T3-L1 ont étéensemencées avec 1 mL ou 2 mL de DMEM 005 + 10% CS dans une plaque de 12 puits (3,5 cm²/puits) ou dans des puits de 35 mm (9,6 cm²) respectivement puis incubées à 37°C à 5 % de CO₂ jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence de 100 %. Deux jours après l'atteinte de la confluence (jour 0), les cellules ont été incubées en présence du milieu d'induction de l'adipogénèse composé de DMEM 005+10% FBS, 115 µg/mL de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX, Sigma #I7018), 1 µM

de dexaméthasone (Sigma #D4902) et 0,167 μM d'insuline (Sigma #I6634) à 37°C à 10% CO_2 . Au jour 3, le milieu a été changé pour du milieu DMEM 005 + 10% FBS avec de l'insuline à 0,167 μM . Aux jours 6 et 8, le milieu a été de nouveau changé avec du DMEM 005+10% FBS. Pour observer l'expression protéique de GLG1 au cours de la différenciation, aux jours 0, 2, 4, 6, 8 et 10, les cellules ont été lysées avec 500 μL de RIPA 1X par puits et les extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardage à la Western avec un anti-GLG1 (Tableau X, Annexe 1) ou un anti-CD36. La quantification de l'expression protéique de GLG1 et de CD36 à partir des immunobuvardages a été effectuée avec le programme IMAGE J en utilisant l'actine comme contrôle pour le chargement sur le gel. Pour le deuxième puits de chaque jour, le milieu a été retiré et 1 mL de riboZol™ (VWR Life sciences #N580) a été ajouté dans chaque puits qui ont été gardés à -80°C. Une extraction d'ARN a été effectuée sur les échantillons dans le riboZol™ (202, 203).

3.15 Quantification des lipides

Après la différenciation des cellules 3T3-L1, au jour 10, la quantité de lipides produits a été mesurée à l'aide de l'*Oil-Red-O* (ORO) (Sigma #O1391). Les puits ont été rincés avec 1 mL/puits de DMEM sans phénol rouge (WISENT #319-050-CL) et les cellules fixées avec 500 μL /puits de paraformaldéhyde 3,6 % (Electron Microscopy Science #15710) (Solution 30, Annexe 2) pendant 30 minutes à température ambiante. Après la fixation, les cellules ont été lavées avec 1 mL/puits d'isopropanol 60% (Fisher Chemical #A451) pendant 30 secondes. Les cellules ont été séchées à température ambiante pour éviter que l'ORO se précipite. Ensuite, 500 μL /puits d'ORO dilué à 0,21% dans de l'eau distillée et filtré avec un filtre de 0,2 μm (PALL #4652) ont été ajoutés aux cellules pendant 30 minutes à température ambiante. Après l'incubation, l'ORO a été lavé quatre fois avec 1 mL/puits d'eau distillée. Les cellules ont été séchées pour 10 minutes avant de solubiliser l'ORO colorant les lipides dans de l'isopropanol 100 % (Fisher Chemical #A451). Les cellules ont été mises sous agitation à température ambiante pendant 10 minutes. Pour permettre une lecture plus précise, le mélange de ORO/isopropanol a été transféré dans une plaque de 96 puits où chaque échantillon a été mis en duplicata. La lecture de la plaque a été effectuée avec le lecteur Synergy 2 où la densité optique a été

mesurée à 500 nm. Il est important de noter que pour avoir un puits contrôle, un puits contenant des cellules n'a pas été coloré avec l'ORO (202, 204, 205).

3.16 Microscopie Confocale

Les cellules 3T3-L1 ont étéensemencées dans des pétris de 35 mm avec un fond de verre optique (MatTek Corporation) et différenciées tel que décrit dans la section 3.15. À la fin de la différenciation, les cellules ont été rincées deux fois avec 2 mL de DMEM blanc (WISENT #319-050-CL) et incubées en présence de 1 μ M de Bodipy FL C16 (Life technologies #D-3821) dilué dans 1 mL de PBS de microscopie (Solution 28, Annexe 2) pour 30 minutes à 37°C (206). Le Bodipy FL C16 marque les gouttelettes lipidiques, car il est soluble dans les lipides. Ceci permet de détecter les adipocytes par fluorescence au microscope. Les cellules ont ensuite été rincées avec du DMEM sans phénol et fixées dans 1 mL de paraformaldéhyde 3,6 % (Electron Microscopy Sciencey Science #15710) (Solution 30, Annexe 2) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS avant de les perméabiliser avec 170 μ L de Triton X-100 0,15% (Fisher Scientific #BP151) pendant 15 minutes à température ambiante. Les groupements acétlys ont ensuite été bloqués avec 170 μ L de glycine 100 mM (BioShop #GLN002,5) pendant 5 minutes à température ambiante. La neutralisation a été suivie du blocage avec 200 μ L d'albumine de sérum bovin 1% (BSA) (Solution 31, Annexe 2) pour 30 minutes à température ambiante. Ce blocage permet d'éviter les liaisons non-spécifiques des anticorps. Après le blocage, les anticorps anti-GLG1 et anti-mLDLR (Tableau X, Annexe 1) ont été dilués dans la solution de blocage (BSA 1%) et ont été ajoutés aux cellules. Ces dernières ont été incubées pour toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les anticorps secondaires fluorescents et le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen D1306) ont été ajoutés pour 45 minutes à température ambiante dans un lieu protégé de la lumière. Les anticorps anti-*rabbit* conjugué à l'Alexa Fluor 555 et anti-*goat* conjugué à l'Alexa Fluor 647 (Tableau XI, Annexe 1) ont permis de détecter et visualiser l'anti-GLG1 et l'anti-LDLR respectivement. Les deux anticorps secondaires ont été dilués dans le tampon de blocage, BSA 1%. En ce qui concerne le DAPI, ce dernier va se lier aux régions riches en adénine et thymine de l'ADN, ce qui permet d'observer le noyau des cellules au

microscope. Le DAPI été utilisé sur les cellules à 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Après l'incubation, 500 μL de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane 5 % (DABCO, Solution 33, Annexe 1) ont été ajoutés au centre du pétri sur le verre optique comme solution de montage qui permet d'améliorer la durée de vie des fluorophores. Les cellules ont été observées au microscope optique Fluoview (Olympus FV10i) (196).

3.17 Diminution de l'expression de GLG1 dans les cellules 3T3-L1 à l'aide d'un siRNA

Pour provoquer une grande diminution de l'expression de GLG1, nous avons utilisé les siRNA siGENOME SMARTpool human GLG1 (siGLG1, Dharmacon™ #M-010597-01) (Tableau VIII, Annexe 1). Même si les cellules 3T3-L1 sont murines, nous avons essayé de diminuer l'expression de GLG1 avec le siRNA ciblant les cellules humaines, car leurs séquences étaient similaires. Le siGLG1 a été dilué avec de l'eau stérile à 20 μM tout comme le siGENOME control pool (siCTL, Dharmacon D-001206-14-20) (Tableau IX, Annexe 1). Les étapes de la transfection sont les mêmes que celle avec le siRNA d'ADAM17 (section 3.8) sauf pour les concentrations des siGLG1 et siCTL qui étaient de 50 nM. Les cellules 3T3-L1 ont par la suite été lysées et l'expression de GLG1 a été mesurée par immunobuvardage à la Western avec l'anti-GLG1 comme anticorps primaire. Une différenciation des fibroblastes en adipocytes en absence de GLG1 a été effectuée tel que décrite plus haut (section 3.15). La seule différence était que les prélèvements des extraits cellulaire ont été faits au jour 0, 3, 6 et 8 (203).

Chapitre 4: Résultats

4.1 Clivage de GLG1-HA

4.1.1 *In vitro*

Pour observer les fragments provenant du clivage de GLG1, s'assurer de l'efficacité de la transfection et mesurer l'expression protéique de GLG1 dans les cellules, des immunobuvardages à la Western avec des gels SDS-PAGE ont été effectués.

4.1.1.1 Le decCMK inhibe la sécrétion de GLG1

Le site de clivage des convertases de proprotéines, (R/K) X_n (R/K), est présent plusieurs fois dans la structure primaire de GLG1. Les cellules HEK 293T surexprimant GLG1-HA ont été incubées en présence de l'inhibiteur des PCSK, le Décanoïl-Arg-Val-Lys-Arg-chlorométhyl cétone (decCMK) à des concentrations de 10 et de 50 μ M pour déterminer la plus petite dose inhibitrice du clivage de GLG1. Ces deux doses ont été choisies selon l'expérience effectuée dans l'étude d'Antoine *et al.* (148). Dans le puits contrôle où il n'y a pas d'inhibiteur, deux bandes sont présentes dans le milieu, une bande de 150 kDa et une bande de 55 kDa. Lorsque les cellules sont incubées avec decCMK à 10 et 50 μ M, le fragment de 55 kDa n'est pas relâché dans le milieu de culture alors que la relâche du fragment de 150 kDa n'est pas inhibée (Figure 12A, indiqué par ★). Pour confirmer l'efficacité de la transfection, la détection de GLG1-HA est primordiale dans les extraits cellulaires. Dans les extraits cellulaires, la protéine complète de 160 kDa est détectée dans tous les puits avec ou sans inhibiteur, ceci confirme l'efficacité de la transfection de GLG1-HA dans les cellules HEK 293T (Figure 12B). Bref, la plus petite dose de decCMK à laquelle il y a une inhibition de la relâche du fragment de 55 kDa est de 10 μ M, alors que la relâche du fragment de 150 kDa n'est pas inhibée.

Il est important de noter que dans les extraits cellulaires, l'anticorps utilisé détecte des fragments communément appelés « *background* » donc signal non-spécifique qui peut être observé dans les figures 12B, 13B, 14B, 14D, 15B, 16B.

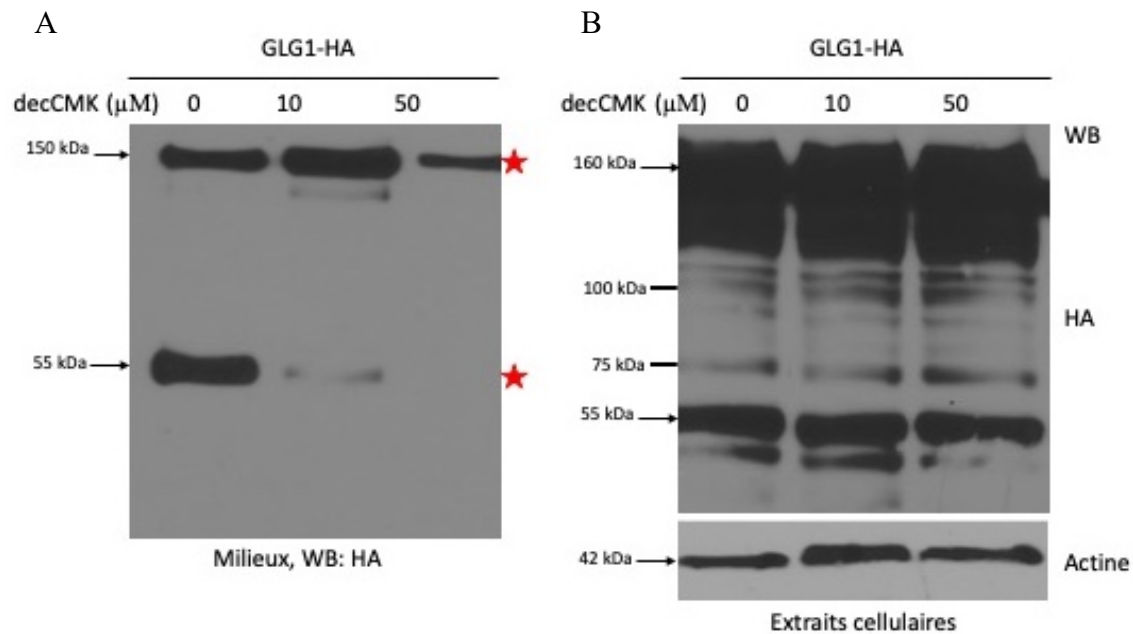


Figure 12 : Inhibition du clivage de GLG1 par Décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlorométhyl cétone (DecCMK).

Immunoblot avec anti-HA sur les milieux (A) et anti-Ha et anti-actine dans les lysats (B) de HEK 293T transfectées avec le plasmide de GLG1-HA mis en présence de decCMK, un inhibiteur spécifique des convertases de proprotéines, pendant 24h en dose croissante (N=3).

4.1.1.2. Les convertases de proprotéines ne sont pas directement responsables du clivage de GLG1

Puisque l'inhibiteur des convertases de proprotéines decCMK inhibe le clivage de GLG1 dans les HEK 293T surexprimant la protéine, il fallait identifier la convertase de proprotéines responsable de la formation du fragment de 55 kDa, puisque l'enzyme précise n'a pas été déterminée dans l'étude sur le clivage de GLG1 effectuée par Antoine *et al.* (148). Pour ce faire, les différentes PCSK soit PCSK6, PCSK5, PCSK7, SKI-1 et Furine ont été co-transfectées en présence de GLG1-HA afin de surexprimer ces protéines et d'étudier leur effet sur la sécrétion du fragment de 55 kDa de GLG1 dans les milieux des HEK 293T. Nous observons que les fragments présents dans les milieux sont présents dans la co-transfection de GLG1 avec le vecteur vide pIRES2.1 ainsi qu'en présence des différentes PCSK (Figure 13A). En effet, le fragment de 55 kDa est présent dans tous les puits dont le puits contrôle. En ce qui concerne le fragment de 150 kDa, en présence de certaines convertases tel que PCSK6, SKI-1 et furine, le fragment est relâché dans le

milieu, mais l'intensité du signal est faible (Figure 13A). Cet effet étant aléatoire entre les différents essais, il serait dû à la transfection de GLG1 qui n'est pas optimale à chaque expérience.

Pour vérifier que GLG1 et chaque PCSK ont été transfectées, les extraits cellulaires ont été analysés. Nos résultats montrent que GLG1-HA est bien exprimée dans les cellules à 160 kDa tout comme les PCSK (détectées par leur épitope V5) (Figure 13B), ce qui indique une transfection efficace. Ceci nous permet de conclure que les convertases de proprotéines ne sont pas directement responsables du clivage et de la génération du fragment de 55 kDa. De plus, il est important de noter que dans la figure présentée ci-dessous, l'effet sur le clivage de GLG1-HA lorsque co-transfectée avec PCSK9 n'est pas représenté, car les deux protéines n'étaient pas bien exprimées dans les cellules, ce qui rendait difficile la détection de GLG1-HA dans le milieu.

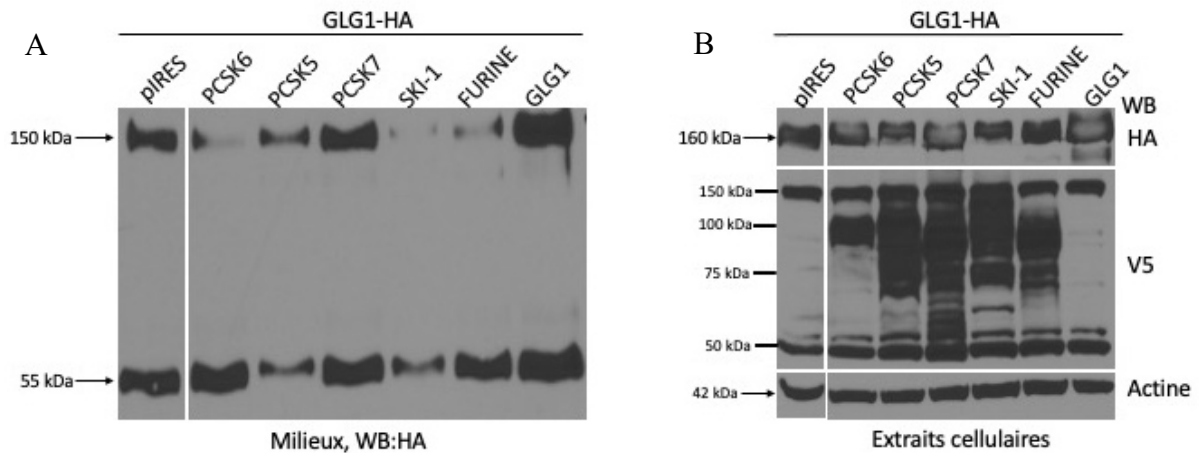


Figure 13 : Absence de clivage complet ou de nouveaux fragments de GLG1 en présence des différents PCSK.

Immunoblot avec anti-HA sur les milieux (A) et anti-HA, anti-V5-HRP et anti-actine dans les lysats (B) de HEK 293T co-transfectées avec le plasmide de GLG1-HA et les différentes convertases de proprotéines (N=3). Le contrôle utilisé est un vecteur vide pIRES2.1.

4.1.1.3 GLG1 est clivée en présence de GM6001 et Marimastat

Puisque les PCSK ne sont pas directement responsables du clivage, nous avons voulu vérifier l'effet des métalloprotéases matricielles sur le clivage de GLG1 (148). En effet, la structure primaire de GLG1 présente des sites de clivages potentiels (PXX↓X_{H_v})

pour les MMP. De plus, les convertases sont responsables de l'activation de plusieurs MMP et pourraient donc être impliquées indirectement dans le clivage de GLG1. Ceci pourrait aussi expliquer pourquoi decCMK a un effet inhibiteur sur le clivage de GLG1. Les cellules HEK 293T surexprimant GLG1-HA ont été incubées avec l'inhibiteur des métalloprotéases GM6001 aux concentrations de 10 et 50 μM (148). Dans le puits contrôle en absence de l'inhibiteur, les fragments de 150 kDa et 55 kDa sont présents dans le milieu. Les fragments de 150 kDa et de 55 kDa sont aussi présents dans le milieu des cellules aux deux concentrations de l'inhibiteur (Figure 14A, indiqué par ★) soit 10 et 50 μM . Par la suite, les HEK 293T surexprimant GLG1-HA ont été incubées avec des concentrations croissantes de 5, 10 et 25 μM d'un deuxième inhibiteur des métalloprotéases, le Marimastat, pour confirmer les résultats obtenus avec le GM6001. En effet, le GM6001 et le marimastat sont des inhibiteurs dérivés du batimastat (222) et qui inhibent une vaste gamme de MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-14 et MMP-26). La différence majeure est la sélectivité entre les inhibiteurs. GM6001 est plus sélectif pour MMP-1, MMP-2 et MMP-7 par rapport à marimastat. Marimastat est plus sélectif pour MMP-24 que GM6001. La figure 14C montre que les fragments générés par le clivage sont toujours présents dans les milieux en présence du Marimastat (Figure 14C, indiqué par ★). L'analyse des extraits cellulaires a confirmé que GLG1-HA est exprimée dans les cellules et que la transfection a fonctionné (Figure 14B/D). L'absence d'effet des deux inhibiteurs indique que les métalloprotéases ne semblent pas être impliquées dans le clivage de GLG1.

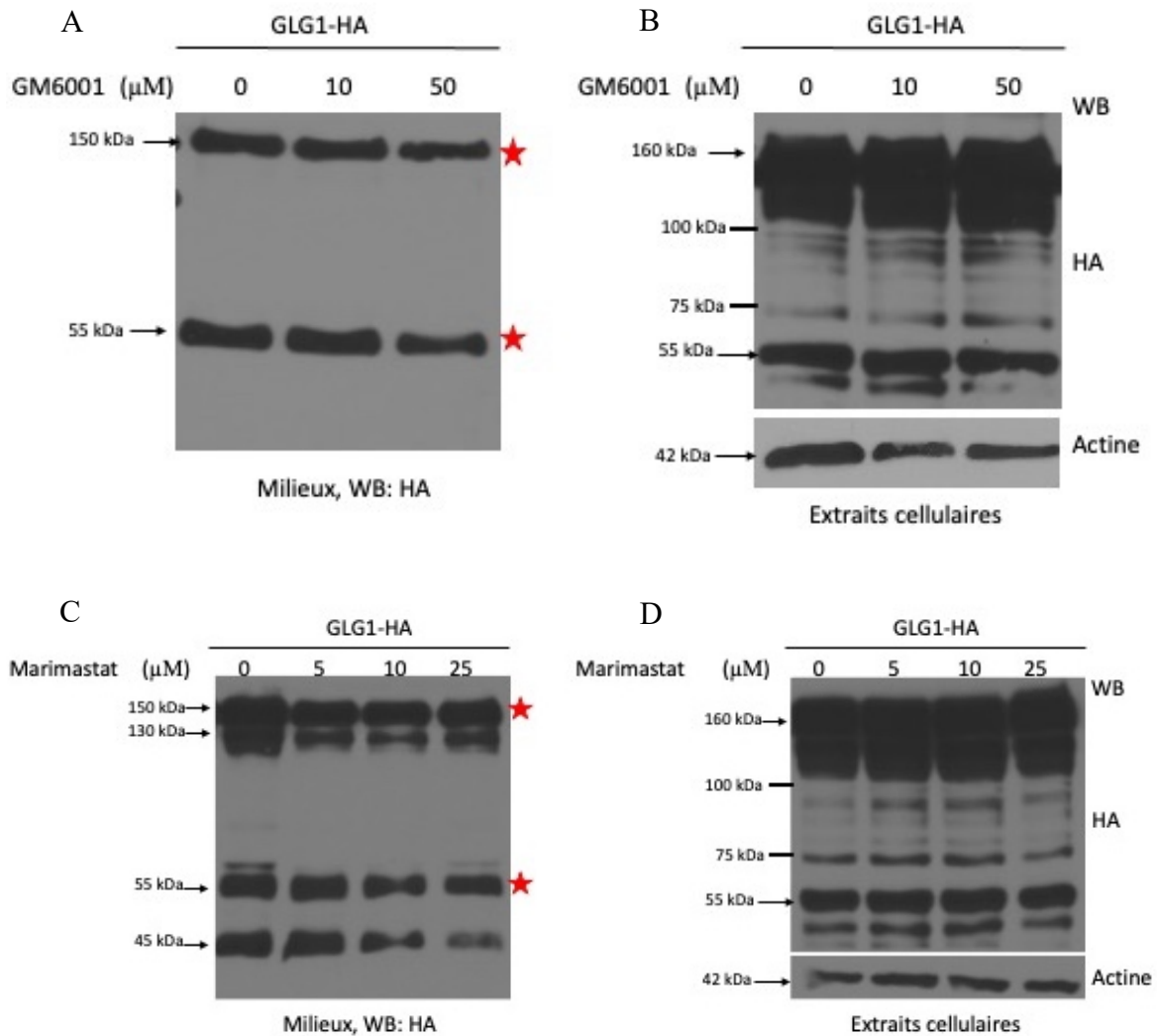


Figure 14 : GLG1 est clivée en présence de GM6001 et de Marimastat.

Immunoblot avec anti-HA sur les milieux (A et C) et anti-HA et anti-actine dans les lysats (B et D) de HEK 293T transfectées avec le plasmide de GLG1-HA en présence de GM6001 (A et B) ou de Marimastat (C et D) pendant 24h en dose croissante (N=3).

4.1.1.4 L'AEBSF inhibe la sécrétion de GLG1

Puisque nos résultats montrent que les inhibiteurs des métalloprotéases ainsi que ceux des convertases de proprotéines n'empêchent pas le clivage de GLG1, nous avons étudié la structure primaire de GLG1-HA de nouveau. En étudiant la structure primaire de GLG1 et en se basant sur l'article d'Antoine *et al.* (148), nous avons identifié des sites de clivage potentiels pour les protéases à sérine apparentées à la trypsine appelées *trypsin-like* puisque ces sites sont similaires à ceux des PCSK ((R/K) X_n (R/K)) où le clivage se produit

à des sites d'acides aminés basiques. Les *trypsin-like* peuvent cliver leurs substrats en C-terminal de résidus arginine (R) ou lysine (K). Un inhibiteur de protéases à sérine, l'AEBSF qui inhibe une grande variété de protéases à sérine dont les *trypsin-like* a été ajouté dans le milieu de culture. Les cellules HEK 293T transfectées avec GLG1-HA ont été incubées avec des doses croissantes d'AEBSF pour déterminer la plus petite dose qui inhibe le clivage de GLG1. La présence de l'inhibiteur aux concentrations de 0,1, 0,3 et 1,0 mM sur les cellules HEK 293T qui surexpriment GLG1-HA a bloqué la sécrétion du fragment de 55 kDa dans le milieu (Figure 15A, indiqué par ★), malgré que la protéine soit bien exprimée à 160 kDa dans les extraits cellulaires (Figure 15B). On peut aussi observer que l'AEBSF inhibe la formation du fragment de 55 kDa dans les extraits cellulaires. La plus petite dose d'inhibition de l'AEBSF est de 0,1 mM. Ceci met en lumière le rôle des protéases à sérine dans le clivage de GLG1.

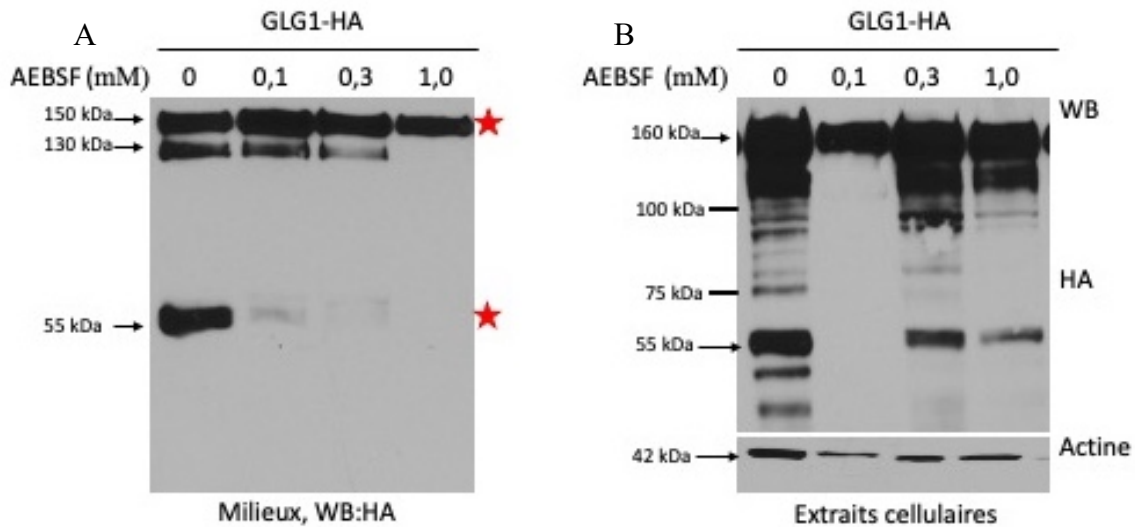


Figure 15 : Inhibition du clivage de GLG1 par l'AEBSF.

Immunoblot avec anti-HA sur les milieux (A) et anti-HA et anti-actine dans les lysats (B) de cellules HEK 293T transfectées avec le plasmide de GLG1-HA en présence de dose croissante d'AEBSF, un inhibiteur des protéases à sérine pendant 24h (N=3).

4.1.1.5 Le Gabexate mesylate inhibe la relargage du fragment de 55 kDa de GLG1 dans le milieu extracellulaire

Ensuite, les cellules HEK 293T surexprimant GLG1-HA ont été incubées avec un inhibiteur des protéases à sérine, le Gabexate mesylate, à une concentration de 1 μ M

pendant 24h. Le Gabexate mesylate inhibe une gamme de protéases à sérine dont les *trypsin-like*. Le Gabexate mesylate a été choisi comme inhibiteur à tester, car les protéases à sérine communes qui sont inhibées par AEBSF et Gabexate mesylate sont les *trypsin-like*. La concentration de Gabexate mesylate a été calculée à partir de la constante d'inhibition (K_i) (228, 229). En absence de Gabexate mesylate, il y a la présence de deux fragments de 150 kDa et de 55 kDa dans les milieux de culture (Figure 16A). En présence de Gabexate mesylate, le fragment de GLG1-HA de 55 kDa n'est plus présent dans le milieu tandis que le fragment de 150 kDa est toujours présent (Figure 16A, indiqué par ★). La protéine complète de 160 kDa qui est présente dans les extraits cellulaires confirme l'efficacité de transfection de GLG1-HA (Figure 16B). De plus, le Gabexate mesylate a aussi inhibé la formation du fragment de 55 kDa dans les cellules (Figure 16B, indiqué par ★). Les résultats obtenus avec l'AEBSF et le Gabexate mesylate indiquent que les protéases à sérine possiblement les *trypsin-like* sont responsables d'un clivage de GLG1 qui génère le fragment de 55 kDa dans le milieu extracellulaire.

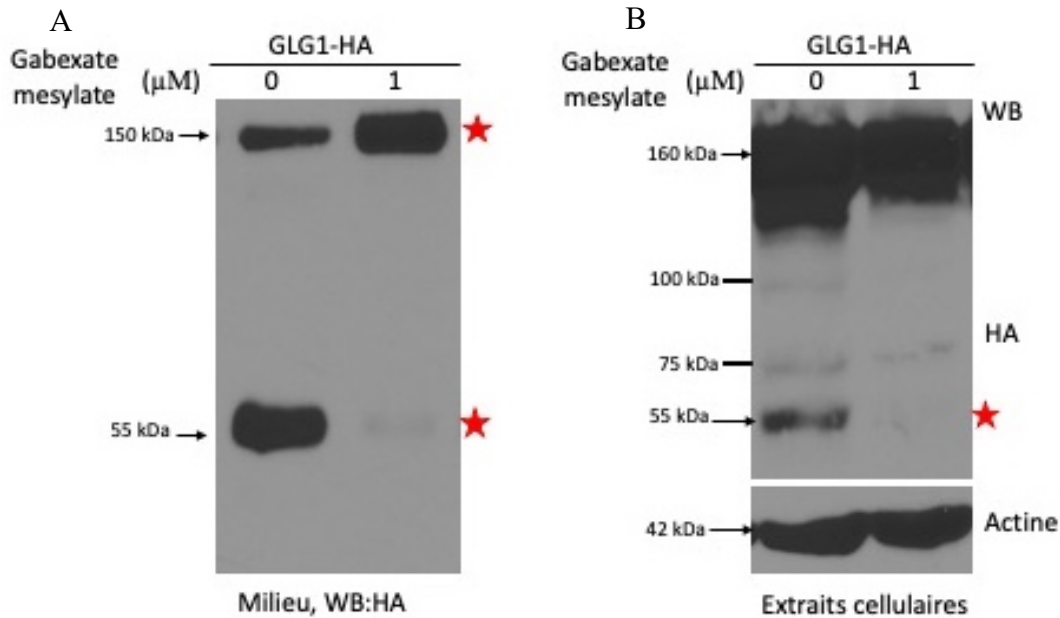


Figure 16 : Inhibition du clivage de GLG1 par Gabexate mesylate.

Immunoblot avec anti-HA sur les milieux (A) et anti-HA et anti-actine dans les lysats (B) de HEK 293T transfectées avec le plasmide de GLG1-HA en présence de Gabexate mesylate, un inhibiteur des protéases à sérine pendant 24h (N=3).

4.1.1.6 Mutagenèse de GLG1 permettant d'identifier les sites de clivage

Ayant évalué la position potentielle des sites de clivage de GLG1 selon la taille des fragments relâchés dans le milieu et selon l'article d'Antoine *et al.* identifiant les sites de clivages possibles des PCSK (148), il a été possible d'identifier trois sites potentiels de clivage des protéases à sérines apparentées à la trypsine soit R423-R424, R453-K454 et R606-R607 qui généreraient le fragment de 55 kDa. Puisque les *trypsin-like* ciblent les acides aminés basiques, des mutations à ces trois sites ont été effectuées pour remplacer les acides aminés basiques arginine (R) et lysine (K) par des alanines (A) (RR, RK sont mutés en AA). Les constructions ont été transfectées dans les HEK 293T. Lorsque GLG1-HA de type sauvage (WT) et les différents mutants ont été surexprimés dans les cellules, le fragment de 55 kDa était toujours présent dans les milieux pour chacune des constructions (Figure 17A, indiqué par ★). Dans les extraits cellulaires, GLG1 et les différents mutants étaient bien exprimés (Figure 17B). Ces résultats indiquent que les sites R423-R424, R453-K454 et R606-R607 de GLG1 ne sont pas des sites de clivage pour les *trypsin-like* et qu'ils ne sont pas impliqués dans la génération du fragment de 55 kDa de GLG1 dans les HEK 293T.

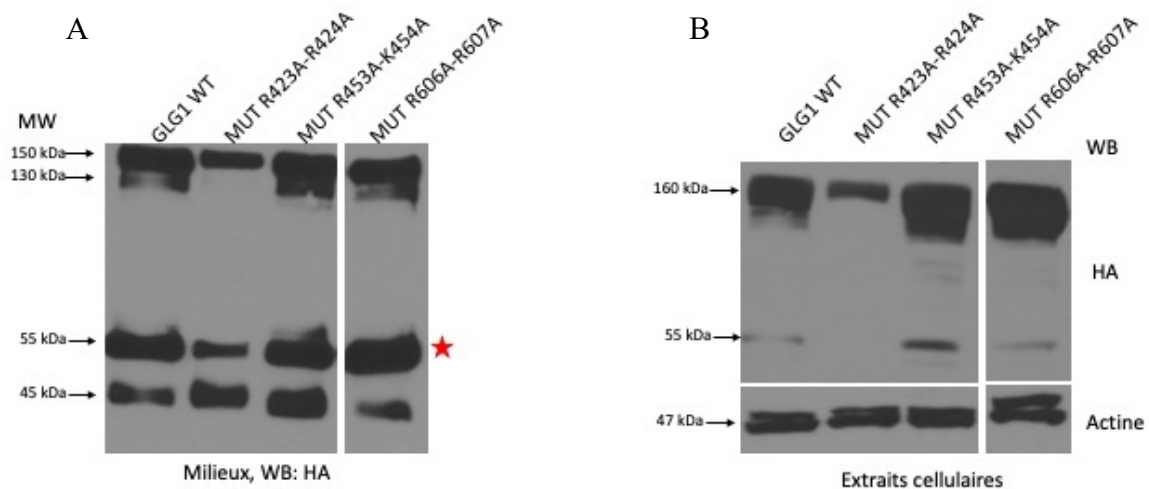


Figure 17 : Les mutations des acides aminés basiques R423A-R424A, R453A-K454A et R606A-R607A

Immunoblot avec anti-HA sur les milieux (A) et anti-HA et anti-actine dans les lysats (B) de HEK 293T transfectées soit avec GLG1 mutée à trois sites soit le mutant R423 (N=3), le mutant R453 (N=3), le mutant R606 (N=3) ou WT dans des cellules HEK 293T.

4.1.1.7 Inhibition du clivage de l'ectodomaine de GLG1 par TIMP3

Lors de l'utilisation des inhibiteurs de protéases decCMK qui inhibe les PCSK, AEBSF et Gabexate mesylate qui inhibent les protéases à sérine telles que les *trypsin-like* et GM6001 et Marimastat qui inhibent les métalloprotéases, le fragment de 150 kDa fut toujours présent dans les milieux de culture des cellules HEK293T. De plus, l'étude Köhl *et al.* (149) a montré que le fragment de 150 kDa est produit par le clivage de l'ectodomaine, communément appelé « *shedding* » où il y a un clivage causant le relargage de la partie extracellulaire des protéines transmembranaires. Les enzymes responsables de la majorité des clivages de l'ectodomaine des protéines transmembranaires sont les *A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein* (ADAM), une famille de 23 membres (192). Pour déterminer l'ADAM responsable de la formation du fragment de 150 kDa, GLG1-HA a été co-transfectée avec chacune des *Tissus Inhibitors of Metalloproteinase* 1 à 4 (TIMP1-4) puisque chacune des TIMP inhibe de façon spécifique un ou des membres de la famille des ADAMs. L'analyse des milieux de HEK 293T co-transfectées montre qu'en présence de TIMP3, les fragments de 150 kDa et de 55 kDa ne sont plus relargués dans les milieux (Figure 18A, indiqué par ★). La surexpression de GLG1-HA et des TIMP1-4 a été confirmée dans les extraits cellulaires (Figure 18B et 18C, respectivement). Pour l'expression de chacune des TIMPs (Figure 18C), les extraits cellulaires des cellules transfectées avec pcDNA3.0 qui est le contrôle ont été comparés aux extraits cellulaires des cellules transfectées avec chaque TIMPs. Les TIMPs sont détectées dans les extraits cellulaires à ≈ 25 kDa (Figure 18C). Le fragment de 150 kDa de GLG1-HA était absent des milieux des HEK 293T en présence de TIMP3, nous avons donc pu émettre l'hypothèse que le clivage est probablement dû à ADAM17 qui est la seule ADAM qui est inhibée seulement par TIMP3 (192) et qui clive plusieurs protéines au niveau de l'ectodomaine (208).

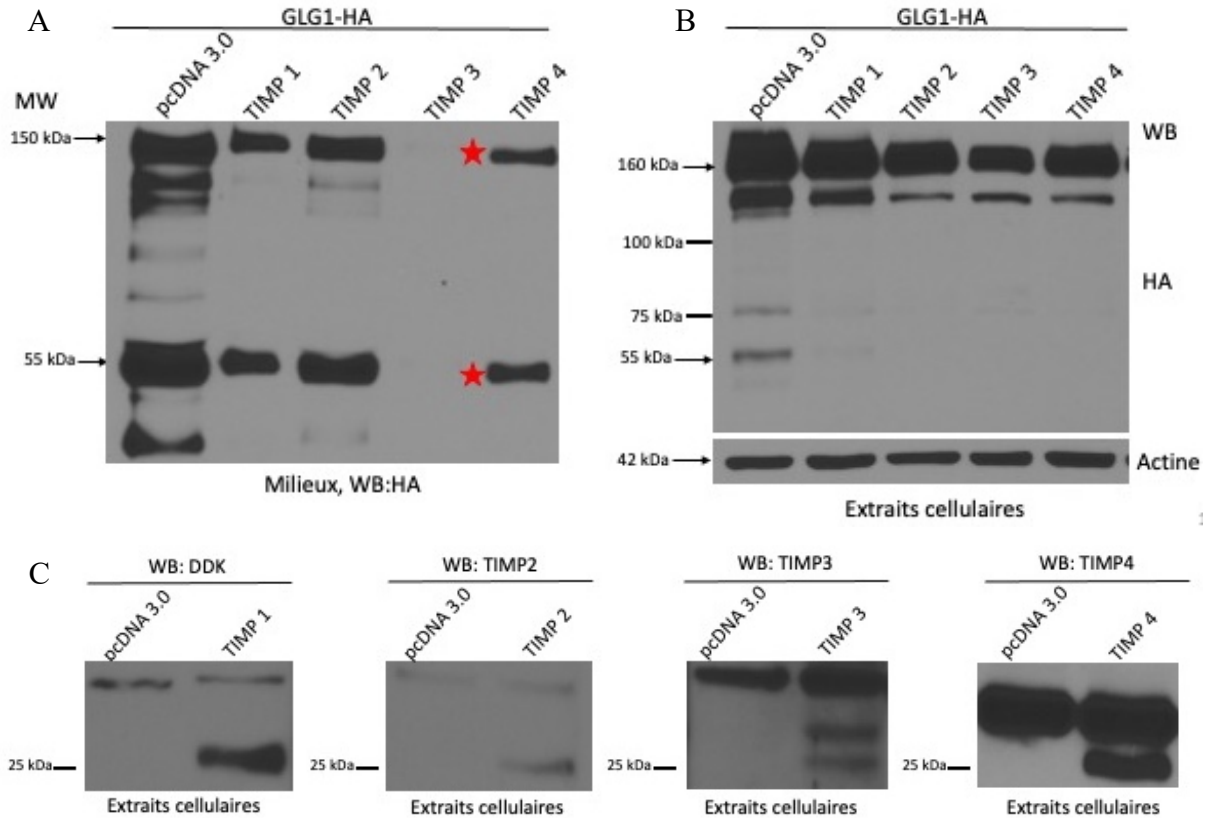


Figure 18 : Inhibition du clivage de l'ectodomain de GLG1 par TIMP3.

Immunoblot avec anti-HA sur les milieux (A) et anti-HA, anti-actine, anti-DDK, anti-TIMP2, anti-TIMP3 et anti-TIMP4 dans les lysats (B et C) de HEK 293T transfectées avec le plasmide GLG1-HA et chacune des TIMPs (N=2).

4.1.1.8 Le fragment de 150 kDa de GLG1 ne semble pas être généré par ADAM17

Pour déterminer si ADAM17 est responsable du clivage de l'ectodomain de GLG1 puisque ADAM17 est inhibée par TIMP3 (192), les HEK 293T ont été transfectées avec un siRNA ciblant ADAM17 à 60 nM ou un siRNA contrôle avant de la transfection du plasmide de GLG1-HA. Pour chaque expérience, il fallait confirmer la diminution de l'expression d'ADAM17 en mesurant l'expression relative de l'ARN messager d'ADAM17 par qPCR (N=1). Nous avons observé que même lorsque l'expression relative de l'ARNm d'ADAM17 (normalisée avec TBP et HPRT) est diminuée de 50% (Figure 19C) et 60% (Figure 19F) par rapport au contrôle, le fragment de 150 kDa est toujours présent dans les milieux (Figure 19A et 19D, indiqué par ★). Lorsque l'expression

d'ADAM17 atteint 50%, il y a une diminution de la relâche du fragment de 55 kDa (intensité plus faible de la bande). Cependant, cette diminution de la relâche du fragment n'a pas été reproductible. Dans les extraits cellulaires (Figure 19B et 19E), GLG1-HA était exprimée, ce qui confirme l'efficacité de transfection de la protéine. Ces expériences ne permettent pas de conclure qu'ADAM17 est responsable du clivage de l'ectodomaine de GLG1.

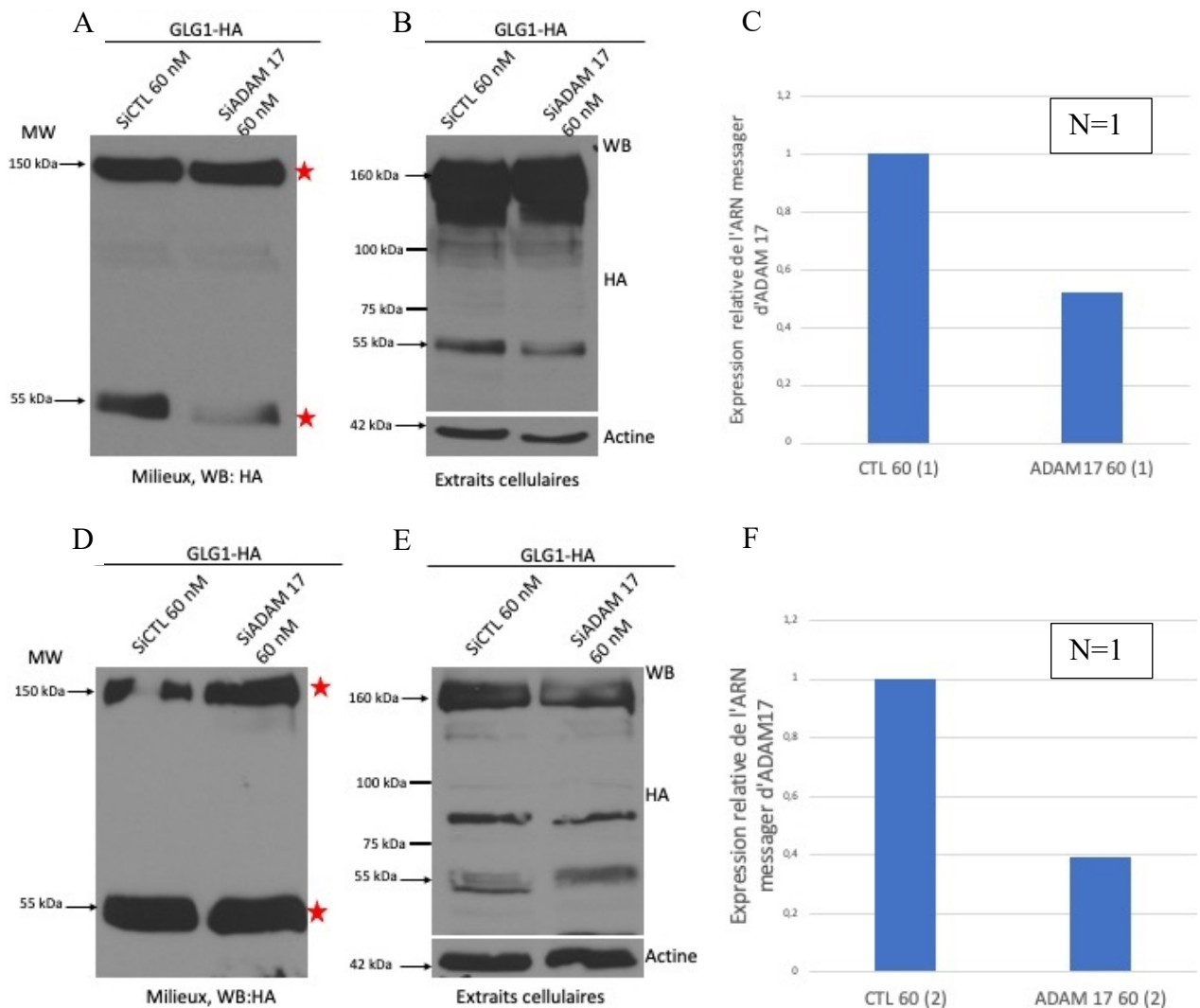


Figure 19 : Le fragment de 150 kDa de GLG1 ne semble pas être généré par ADAM17

Immunoblot avec anti-HA sur les milieux (A et D) et anti-HA et l'anti-actine dans les lysats (B et E) de HEK 293T avec un siRNA contre ADAM17 ou un siCTL ont été transfectées avec le plasmide GLG1-HA (N=2). PCR en temps réel pour mesurer l'expression de l'ARNm d'ADAM17 (C et F) normalisée avec TBP et HPRT dans les cellules HEK 293T transfectées avec un siRNA contre ADAM17 (N=1) pour chaque Immunoblot.

4.1.1.9 Caractérisation de la glycosylation des fragments de GLG1

Des fragments de 138 kDa et de 45 kDa apparaissent sur certains gels aléatoirement (Figures 14C et 17A). Puisqu'il a été décrit dans l'étude du clivage de GLG1 d'Antoine *et al.*, que la protéine est N-glycosylée à 5 sites (148), une déglycosylation a été effectuée avec la PNGase F pour déterminer si ces fragments constituent des formes non-glycosylées de GLG1 et pour évaluer la taille de ces fragments avec plus d'exactitude. Dans les milieux des HEK 293T surexprimant GLG1-HA, la déglycosylation par PNGase F génère des fragments de 137 kDa, de 117 kDa, de 50 kDa et de 37 kDa (Figure 20A), alors que les tailles des fragments dans le milieu avec la protéine non déglycosylée donc qui n'a pas été incubée avec la PNGase F sont de 150 kDa, 130 kDa, 55 kDa et 45 kDa (Figure 20A). Dans les extraits cellulaires, les fragments de la protéine déglycosylée sont de 144 kDa, de 130 kDa et de 50 kDa, alors que la protéine glycosylée a des fragments de 160 kDa, de 140 kDa et de 55 kDa (Figure 20B). Ceci confirme que la protéine et les fragments retrouvés dans le milieu sont N-glycosylés dans nos expériences et que les fragments de 138 kDa et de 45 kDa (Figures 14C et 17A) ne sont pas des fragment de GLG1 non-glycosylées.

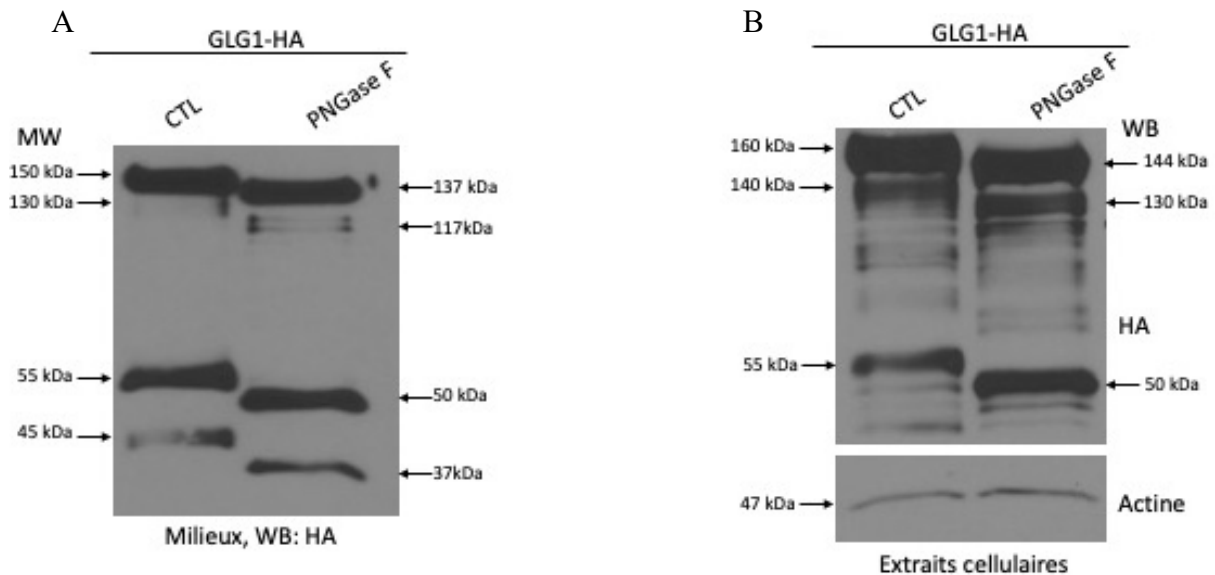


Figure 20 :Caractérisation de la glycosylation des fragments de GLG1.

Immunoblot avec anti-HA sur les milieux (A) et anti-HA et l'anti-actine dans les lysats (B) de HEK 293T transfectées avec la protéine GLG1 glycosylée et déglycosylée (N=1) incubée pendant 1h avec la PNGase F.

Pour conclure, dans les cellules HEK293T, lorsque GLG1 est incubée avec un inhibiteur des protéases à sérine apparentées à la trypsine soit le Gabexate mesylate et l'AEBSF (Figures 15A et 16A) le fragment de 55 kDa n'est pas relâché dans le milieu. Pour déterminer le site de clivage de GLG1, trois sites ont été étudiés en se basant sur l'article d'Antoine *et al.* Aucun des sites ne correspond au site de clivage de GLG1, car en faisant une mutation (R423A-R424A, R453A-K454A et R606A-R607A) aux trois sites le fragment de 55 kDa est toujours relâché dans le milieu (Figure 17A).

Le fragment de 150 kDa est relâché lors du clivage de l'ectodomaine de GLG1. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer l'enzyme responsable. En effet, notre hypothèse était que GLG1 est clivée par ADAM17, car il y a une inhibition du clivage par TIMP3 qui est un inhibiteur d'ADAM17 (Figure 18A). Cependant, lorsque l'expression de l'ARNm d'ADAM17 est diminuée de 50% et 60 %, GLG1 est toujours clivée à l'ectodomaine (Figure 19).

4.1.2 Expériences *In vivo* chez les souris

Aucune publication n'a pu démontrer jusqu'à maintenant que le clivage de GLG1 se produit dans les conditions physiologiques *in vivo*. Nous avons voulu confirmer le clivage de GLG1 chez la souris. De plus, une étude *in vivo* est intéressante, car elle permettra d'étudier l'effet du clivage de GLG1 sur le métabolisme des lipides chez la souris.

Pour déterminer si les fragments de GLG1 se retrouvent dans des conditions physiologiques *in vivo*, nous avons soit fait surexprimer GLG1-HA à l'aide d'un vecteur AAV8 ou réduit l'expression de GLG1 endogène à l'aide d'un vecteur AAV8-shRNA contre GLG1. Les souris C57BL/6 âgées de 10 semaines ont reçu un AAV8 via une injection intraveineuse (IV) dans la veine de la queue avec une dose de 1×10^{11} *Viral Genome* (VG)/souris pour les souris injectées avec AAV8-mGLG1-HA, AAV8-vide, ou AAV-8-pZAC2.1-mGLG1-HA ou 3×10^{11} (VG)/souris pour les souris injectées avec

AAV8-pU6-shGLG1 et AAV8-pU6-shCTL (Ardo *et al.*, en préparation). Les prélèvements sanguins et du foie ont été effectués 19 jours après l'injection des souris avec le virus ou 90 jours pour les souris injectées avec AAV8-pU6-shGLG1 et AAV8-pU6-shCTL (Ardo *et al.*, en préparation).

4.1.2.1 Présence de deux fragments de GLG1 dans le plasma de souris

L'anticorps anti-h/mGLG1 a été utilisé pour détecter la présence de GLG1 endogène dans les plasmas. Cet anticorps reconnaît une séquence du N-terminal juste avant le domaine transmembranaire soit une détection de la lysine 1048 à l'asparagine 1154 (Figure 21).

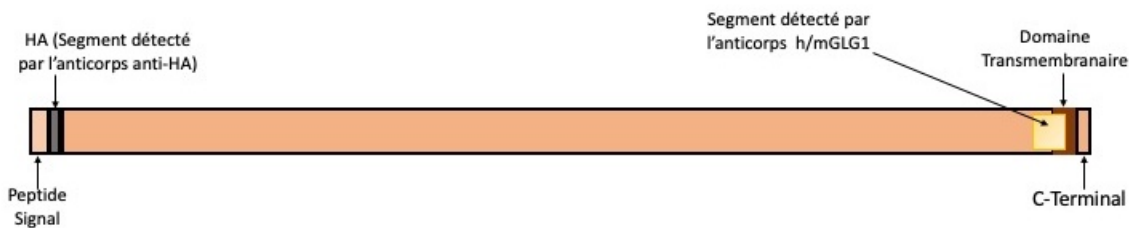


Figure 21 : Schéma de la structure primaire de GLG1 avec les sites de détection des anticorps anti-HA et anti h/mGLG1

L'anticorps anti-HA détecte l'épitope HA (le segment après le signal peptide) alors que l'anti-h/mGLG1 détecte entre la lysine 1048 à l'asparagine 1154. Cette différence de site de détection donne des tailles de fragments différents.

L'immunobuvardage à la Western avec les plasmas de souris C57BL/6 a permis de détecter deux fragments de GLG1 qui sont de 150 kDa et de 95 kDa (Figure 22A). Le fragment de 150 kDa est identique à celui détecté dans les milieux de cellules HEK 293T surexprimant GLG1-HA. Le fragment de 95 kDa détecté avec l'anticorps h/mGLG1 est équivalent à celui de 55 kDa détecté avec l'anti-HA dans les HEK293T-GLG1-HA; l'anti-HA étant dirigé contre l'extrémité N-terminale de la protéine et l'anti-h/mGLG1 contre la partie N-terminale du domaine transmembranaire (Figure 21). Les extraits de foie d'une souris exprimant shCTL et d'une souris exprimant shGLG1 ont aussi été analysés. Dans le foie de la souris contrôle, GLG1 a été détectée à 150 kDa (encadrée en rouge) alors que dans la souris shGLG1, aucune bande n'a été détectée (Figure 22B). Ceci a confirmé la spécificité de détection de l'anticorps et l'efficacité du *knockdown* de GLG1 *in vivo*.

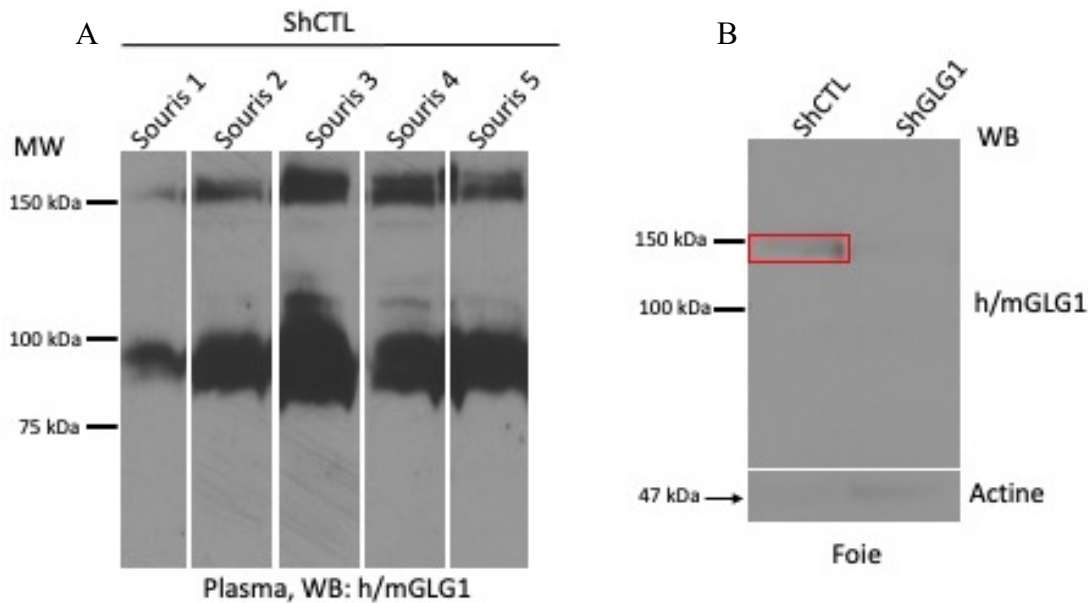


Figure 22 : Fragments de GLG1 dans le plasma de souris C57BL/6.

Immunoblot avec anti-h/mGLG1 sur les plasmas (A) (n=5 souris) (N=1) et les extraits de foie (B) (n=1 souris) (N=1) de souris C57BL/6 injectées avec des particules virales qui permettent le *knockdown* de GLG1 (shGLG1) et les souris contrôles (shCTL).

4.1.2.2 Analyse des extraits de foie des souris injectées avec AAV8-mGLG1-HA

Pour confirmer le clivage de GLG1 *in vivo* et avoir des résultats comparatifs à ceux obtenus *in vitro*, GLG1-HA a été surexprimée dans des souris C57BL/6 à l'aide d'AAV8 contenant pAAV-mGLG1-HA ou pZAC2.1-mGLG1-HA. Trois souris contrôles ont été injectées avec AAV8-vide. Dix-neuf jours post-injection, les extraits protéiques du foie des souris ont été analysés par immunobuvardage à la Western pour confirmer la présence de GLG1-HA. Nous observons une bande spécifique de 160 kDa (Figure 23, indiqué par la flèche) présent chez les souris injectées avec le virus surexprimant GLG1-HA soit le virus AAV8-mGLG1-HA. Le fragment est absent dans les extraits de foie des souris injectées avec le virus contenant le plasmide contrôle soit AAV8-vide ou le virus exprimant le plasmide pZAC2.1 qui surexprime GLG1-HA soit AAV8-pZAC2.1-mGLG1-HA (Figure 23). Ceci confirme que GLG1-HA est exprimée dans le foie des souris infectées avec le AAV8-mGLG1-HA et que l'expérience avec le vecteur pZAC2.1 n'a pas fonctionné pour la surexpression de GLG1-HA.

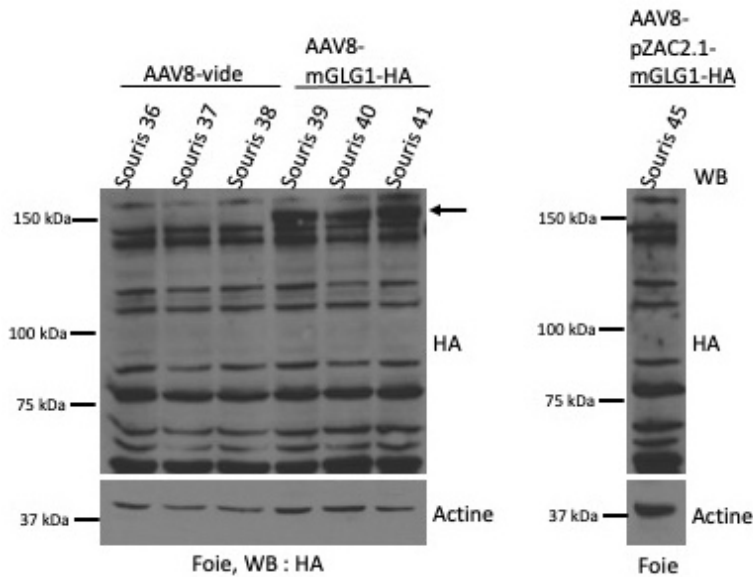


Figure 23 : Analyse des extraits de foie des souris surexprimant mGLG1-HA.

Immunoblot avec anti-HA et anti-actine dans les extraits de foie prélevés 19 jours post-injection chez les souris C57BL/6 de 10 semaines injectées avec AAV8-mGLG1-HA (n=3 souris) (N=1), AAV8-vidé (n=3 souris) (N=1) ou AAV8-pZAC2.1-mGLG1-HA (n=1 souris). La flèche indique la présence de GLG1-HA.

Pour confirmer la présence de fragments issus du clivage de GLG1 dans le plasma, des immunoprécipitations (IP) ont été effectuées sur les plasmas des souris injectées avec AAV8-mGLG1-HA et AAV8-vidé en utilisant l'anticorps anti-HA. Chaque échantillon a été chargé sur un gel SDS-PAGE pour être détecté avec l'anticorps anti-HA. Cependant, ces expériences n'ont pas fonctionné (N=4). La cause probable serait que l'anticorps ne fonctionnerait pas bien en immunoprécipitation ou bien que la surexpression de GLG1-HA n'était pas assez forte.

4.1.2.3 Analyse de l'expression et de la sécrétion d'apoB48 et apoB100 chez les souris surexprimant GLG1-HA

Finalement, puisque qu'une déficience en GLG1 cause une diminution de la sécrétion de l'apoB (Samami *et al.*, en préparation), l'effet de la surexpression de GLG1-HA sur l'expression et la sécrétion de l'apoB48 et l'apoB100 dans les souris C57BL/6 injectées avec AAV8-mGLG1-HA a été mesuré. Dans les extraits de foie, l'expression protéique de l'apoB48 et apoB100 n'était pas significativement modifiée (p=1 et p=0,81 respectivement) entre le groupe injecté avec AAV8-vidé et AAV8-mGLG1-HA (Figure 24 A et B). Dans les plasmas des souris, les niveaux d'apoB48 et d'apoB100 n'ont pas varié significativement (p=0,55 et p=0,41 respectivement, Figure 24 C et D) entre le groupe

injecté avec AAV8-*vide* et AAV8-mGLG1-HA. Donc, dans ces expériences (n=1), la surexpression de GLG1 n'a eu aucun effet sur la sécrétion et l'expression de l'apoB48 et l'apoB100.

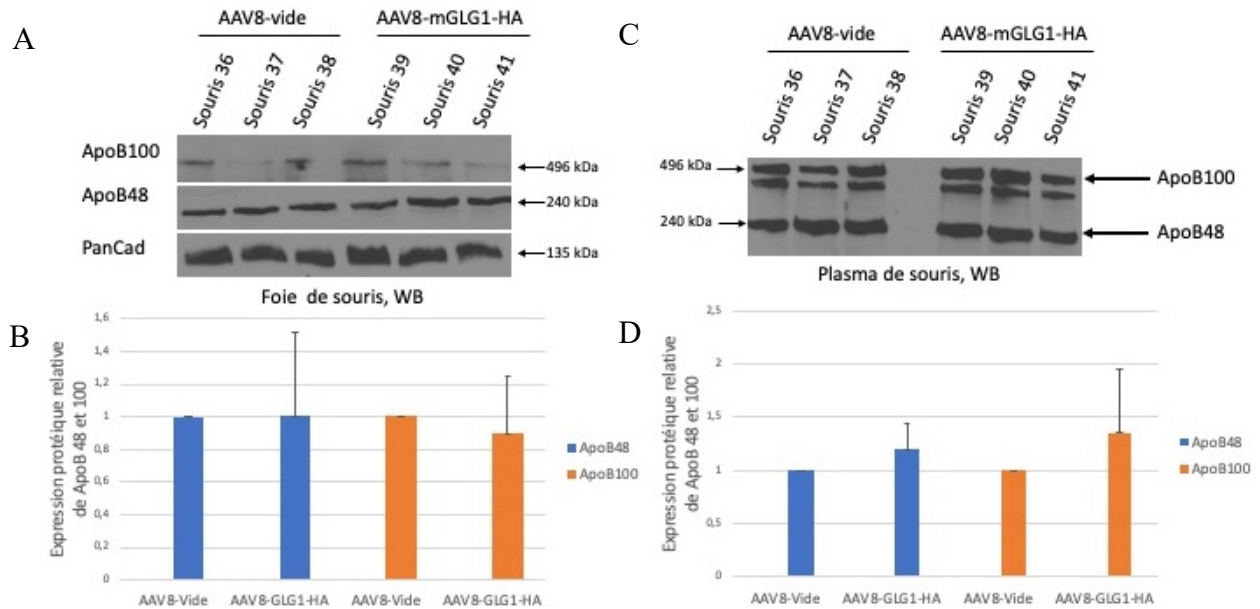


Figure 24 : Analyse de l'expression et la sécrétion relative moyenne d'apoB48 et apoB100 chez les souris injectées avec AAV8-*vide* et AAV8-mGLG1-HA.

Immunoblot avec anti-ApoB et anti-PanCad, dans les extraits de foies (A) et anti-ApoB dans les plasmas (C) prélevés 19 jours post-injection chez les souris C57BL/6 injectées avec AAV8-mGLG1-HA (n=3 souris) (N=1) et AAV8-*vide* (n=3 souris) (N=1). Quantification par densitométrie avec Pan-Cadhérine pour normaliser les résultats des extraits de foie (B) et les plasmas (D) en comparant les souris injectées avec AAV8-*vide* avec ceux injectées avec AAV8-mGLG1-HA. Moyenne ± Écart-type.

4.2 GLG1 et la différenciation des adipocytes

4.2.1 L'expression protéique de GLG1 varie significativement au cours de la différenciation des fibroblastes en adipocytes

Nos collaborateurs ont noté que les souris *Glg1*^{-/-} ont un nombre plus important d'adipocytes, mais que les adipocytes sont de tailles plus petite que chez les souris de type sauvage (article non publié). Pour pouvoir caractériser le rôle de GLG1 dans la formation des adipocytes, nous avons premièrement mesuré l'expression de la protéine durant la différenciation des fibroblastes en adipocytes. Les cellules 3T3-L1 ont été différenciées en adipocytes pendant 10 jours et l'expression protéique de GLG1 a été mesurée. Nous avons observé une augmentation significative de l'expression protéique de GLG1 aux jours 2, 4,

6 et 10 ($p=0,005$, $p=0,01$, $p=0,001$ et $p=0,02$ respectivement, Figure 25 A/B, indiqué par *). Ceci montre que l'expression protéique de GLG1 augmente au cours de la différenciation et que la protéine a possiblement un rôle dans l'adipogénèse. L'expression protéique de CD36 est utilisée afin de valider le processus de différenciation, car l'expression de CD36 augmente au cours de la différenciation (66). La Figure 26 B montre une diminution significative de l'expression de CD36 au jour 2 ($p=0,00005$) suivit d'une augmentation significative aux jours 6 et 8 ($p=0,03$ et $p=0,02$ respectivement). L'expression de CD36 confirme que la différenciation a eu lieu de façon efficace.

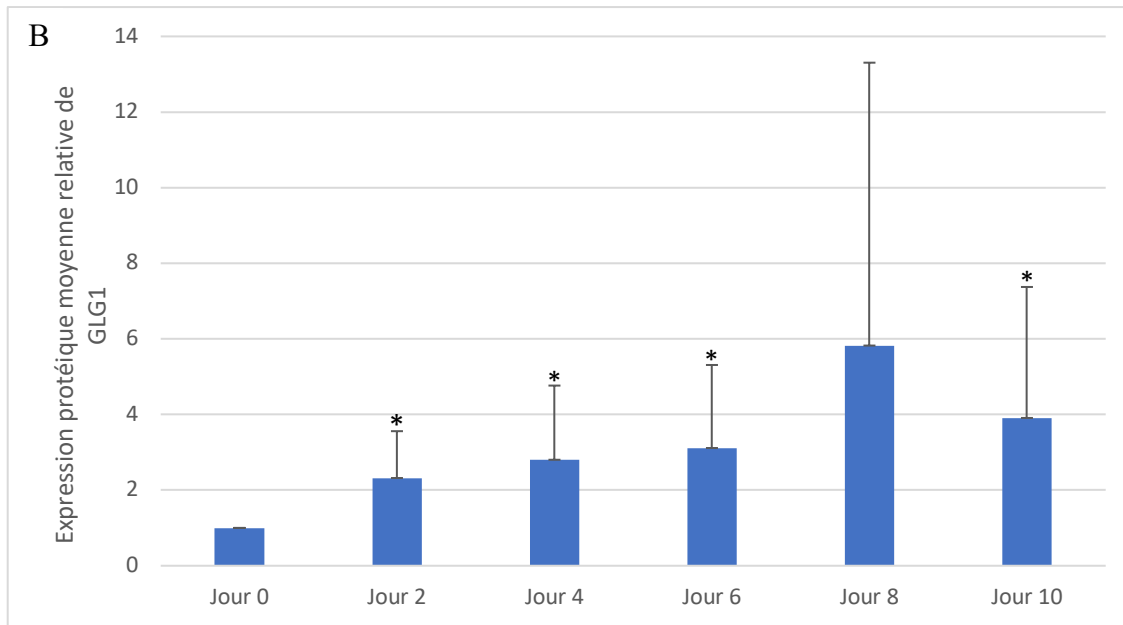
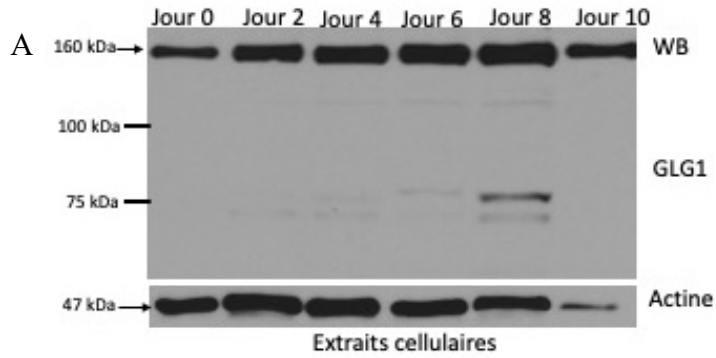


Figure 25 : Expression protéique de GLG1 dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.

- A- Immunoblot avec anti-GLG1 qui est représentatif de l'expression de GLG1 durant la différenciation des 3T3-L1 en adipocytes. Résultats normalisés avec l'actine (N=5).
- B- Densitométrie et normalisation avec l'actine de l'expression protéique de GLG1 à l'aide du logiciel Image J. * : P < 0,05 par Test de Student ; Moyenne ± Écart-type

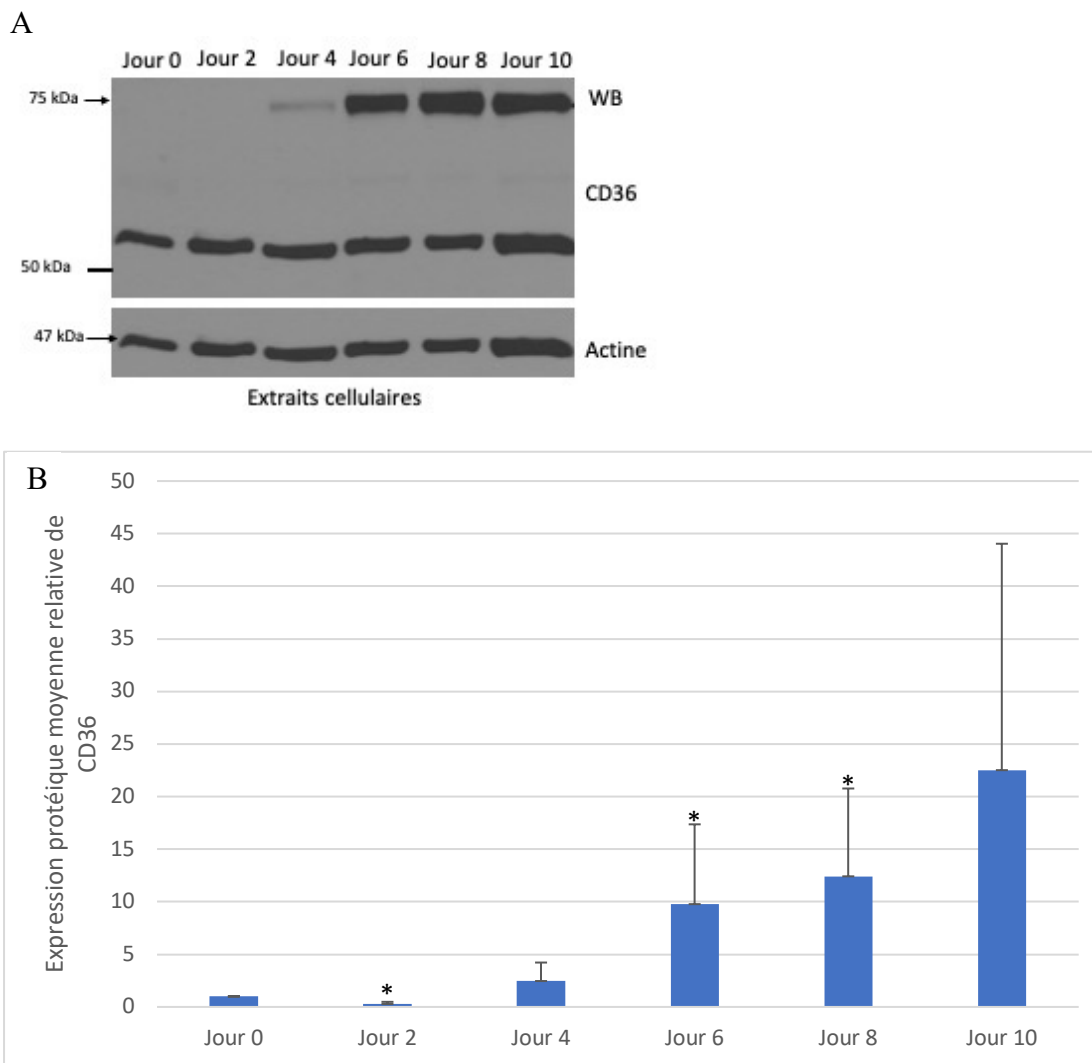


Figure 26 : Augmentation de l'expression protéique moyenne relative de CD36 dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.

A- Immunoblot avec anti-CD36 qui est représentatif de l'expression de CD36 durant la différenciation des 3T3-L1 en adipocytes. Résultats normalisés avec l'actine (N=5).

B- Densitométrie et normalisation avec l'actine de l'expression protéique de CD36 à l'aide du logiciel Image J. * : P < 0,05 par Test de Student ; Moyenne ± Écart-type

4.2.1.2 Analyse de l'expression de l'ARNm de GLG1 au cours de la différenciation

La mesure de l'expression protéique de GLG1 par immunobuvardage et densitométrie est semi-quantitative, donc pour avoir une mesure quantitative précise et pour confirmer les résultats obtenues, l'expression de l'ARNm de GLG1 durant la différenciation a été mesurée par qPCR. Nous avons mesuré une augmentation de

l'expression de l'ARNm de GLG1 qui n'est pas significative (Figure 27). La tendance à une augmentation de l'expression de l'ARNm de GLG1 supporte les résultats obtenus pour son expression protéique. Afin de valider le processus de différenciation, l'expression de l'ARNm de trois contrôles de la différenciation (facteurs de différenciation) a été mesurée. Ces contrôles sont PPAR γ_2 et C/EBP α qui augmentent au cours de la différenciation et Pref-1 qui diminue au cours de la différenciation (59, 66). L'étude de l'expression de Pref-1 est aussi intéressante, car Pref-1 et GLG1 interagissent ensemble et une étude par Miyaoka *et al.* a montré que les deux protéines ont des fonctions opposés (159). Nous avons observé une augmentation significative de PPAR γ_2 , aux jours 2, 8 et 10 (p=0,02 , p=0,03 et p=0,001 respectivement, Figure 28, indiqué par *). En ce qui concerne C/EBP α , l'expression de son ARNm était augmentée au cours de la différenciation et l'augmentation était significative aux jours 2, 4 et 8 (p=0,03 , p=0,01 et p=0,02 respectivement, Figure 29, indiqué par *). Pour les jours 6 et 10, l'expression était augmentée mais pas significativement (Figure 29). En ce qui concerne Pref-1, la diminution de l'expression de son ARNm était significative à tous les jours (p=0,0007, p=0,0005, p=0,000003, p=0,0004 et p=0,02 respectivement, Figure 30, indiquée par *). L'augmentation de l'expression des ARNm de PPAR γ_2 et C/EBP α et la diminution de l'expression de l'ARNm de Pref-1 démontre que le processus de différenciation a eu lieu correctement, car il est conforme à ce qui est attendu dans la littérature (59, 66, 209).

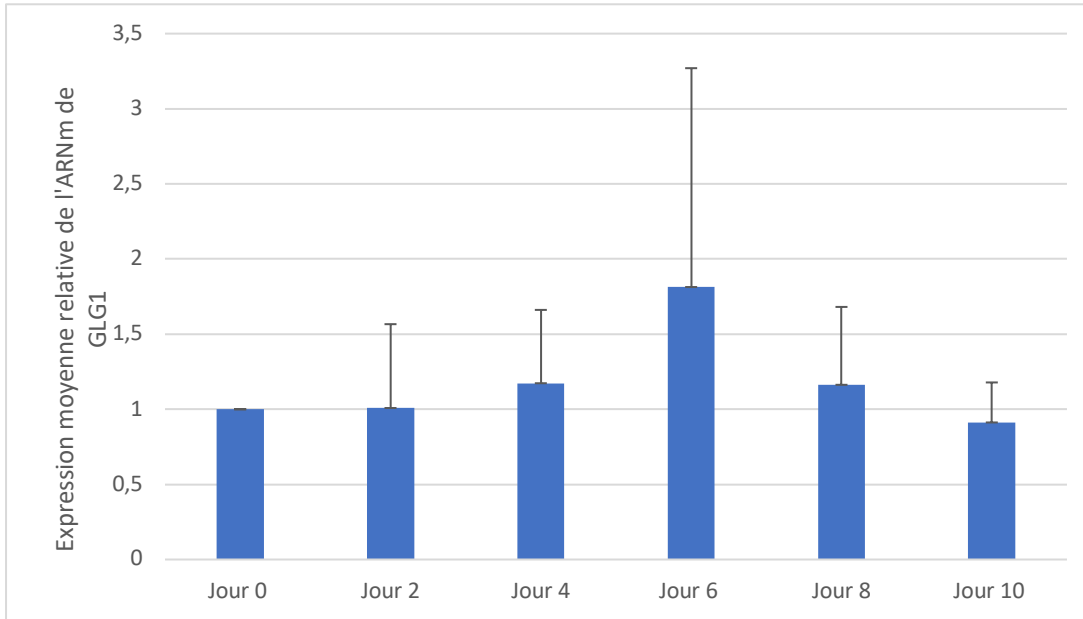


Figure 27 : Expression moyenne relative de l'ARNm de GLG1 dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.

PCR en temps réel pour mesurer l'expression de l'ARNm de GLG1 à différents jours pendant la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes. Les résultats sont normalisés avec TBP et HPRT (N=4). P mesuré par Test de Student ; Moyenne \pm Écart-type.

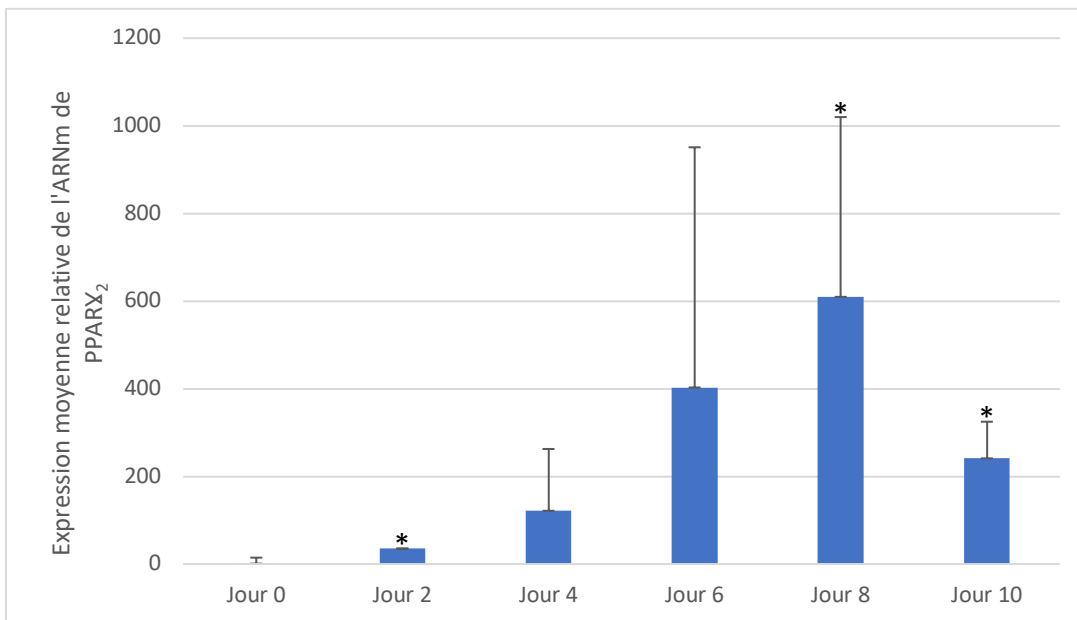


Figure 28 : : Expression moyenne relative de l'ARNm de PPAR γ_2 dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.

PCR en temps réel pour mesurer l'expression de l'ARNm de PPAR γ_2 à différents jours pendant la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes. Les résultats sont normalisés avec TBP et HPRT (N=4). * : P < 0,05 par Test de Student ; Moyenne \pm Écart-type

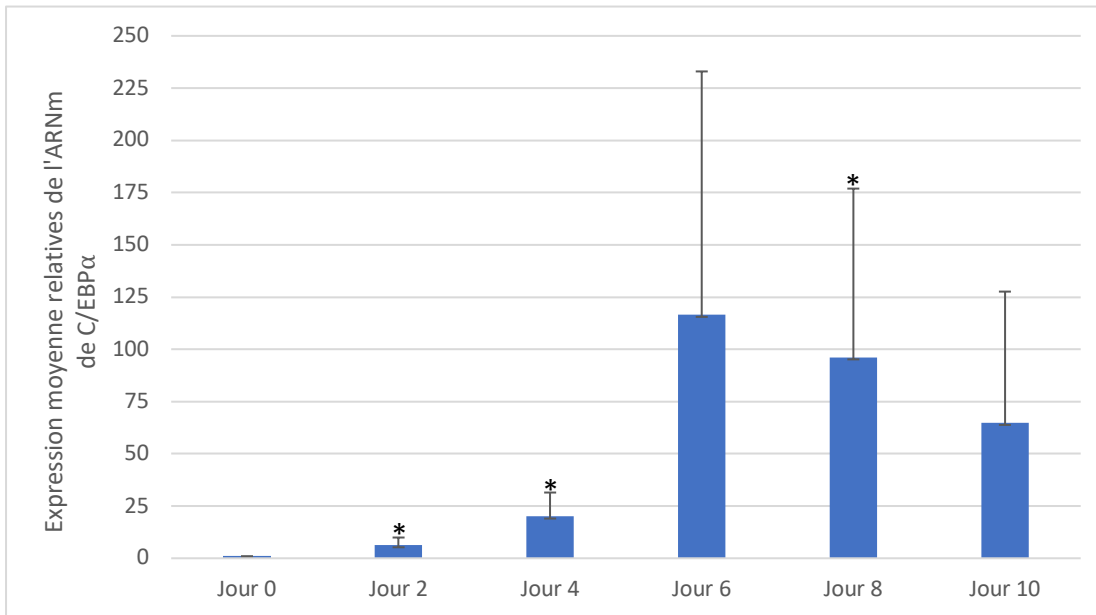


Figure 29 : : Expression moyenne relative de de l'ARNm de C/EBPα dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.

PCR en temps réel pour mesurer l'expression de l'ARNm de C/EBPα à différents jours pendant la différenciation des cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes. Les résultats sont normalisés avec TBP et HPRT (N=4). * : P <0,05 par Test de Student ; Moyenne ± Écart-type

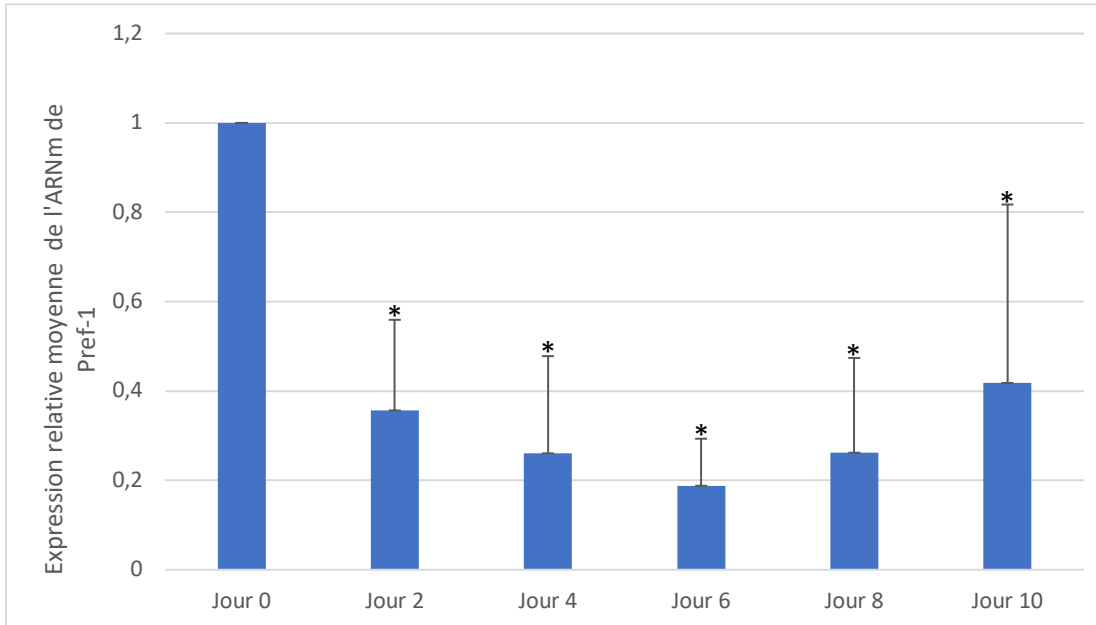


Figure 30 : Expression moyenne relative de l'ARNm de Pref-1 dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes.

PCR en temps réel pour mesurer l'expression de l'ARNm de Pref-1 à différents jours pendant la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes. Les résultats sont normalisés avec TBP et HPRT (N=4). * : P <0,05 par Test de Student ; Moyenne ± Écart-type.

4.2.1.3 Quantification des lipides et détection des gouttelettes lipidiques et de GLG1 par immunofluorescence dans les adipocytes

La quantification des lipides a été effectuée 10 jours après l'initiation de la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes. Cette quantification permet de déterminer la quantité de gouttelettes lipidiques qui se sont formées lors de la différenciation des fibroblastes de type sauvage en adipocytes. Le nombre de gouttelettes lipidiques, mesuré par une quantification avec l'ORO par cm^2 moyen, est de $0,19 \pm 0,038$ gouttelette/ cm^2 (N=5).

Nos observations par microscopie confocale ont permis de visualiser 1) la présence de gouttelettes lipidiques dans les cellules différenciées, 2) GLG1 située dans l'appareil de Golgi et 3) LDLR dans le Golgi et à la surface des cellules (Figure 31). La microscopie confocale a permis d'observer la colocalisation de GLG1 et de LDLR dans le Golgi des cellules 3T3-L1 différenciées (Figure 31).

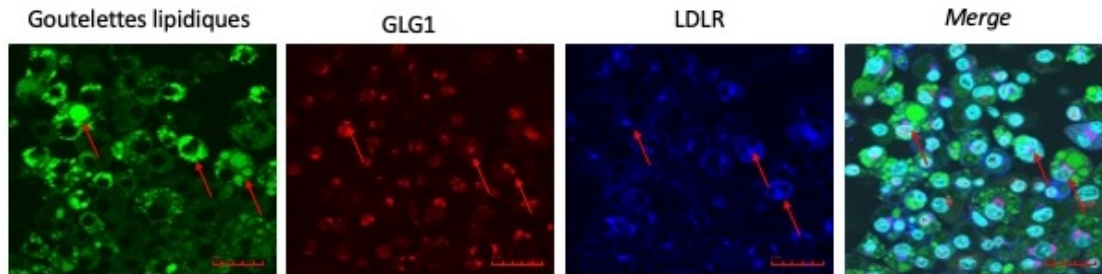


Figure 31 : Immunolocalisation de GLG1 et de LDLR observée par microscopie confocale à fluorescence.

Marquage par Immunofluorescence représentatif des gouttelettes lipidiques qui sont détectées par le *Bodipy FL C16* (Alexa-488, Vert), de GLG1 qui est détectée par Alexa Fluor 555 (rouge) et de LDLR qui est détecté par Alexa Fluor 647 (bleu) (N=5). La barre d'échelle représente 40 μm .

4.2.1.4 *Knockdown* de GLG1 dans les cellules 3T3-L1

Pour déterminer le rôle de GLG1 sur la différenciation des adipocytes nous avons d'abord utilisé un siRNA contre GLG1 (siGLG1), en se basant sur l'article de Tsuchiya *et al.* dont l'étude a été effectuée sur des cellules 3T3-L1 avec un *knockdown* à l'aide d'un siRNA (210). La concentration optimale pour obtenir un *knockdown* de GLG1 avec

siGLG1 soit 50 nM a été déterminée avec des essais effectués dans le laboratoire sur plusieurs types cellulaires tel que HEK293 et HEPG2. L'analyse de l'expression de GLG1 dans les extraits cellulaires 72h après avoir transfecté le siGLG1 montre que l'expression de GLG1 est fortement diminuée alors que dans les cellules transfectées avec un siRNA contrôle (siCTL), la protéine est présente (Figure 32). Nous avons ensuite mesuré l'expression de GLG1 lors des 8 jours de différenciation des cellules 3T3-L1 en présence du siGLG1 ou du siCTL. L'analyse des extraits cellulaires montre qu'au jour 0, 48h après la transfection du siRNA, l'expression de GLG1 par rapport au siCTL est diminuée (Figure 33). Cependant, à partir du jour 3 et jusqu'au jour 8, l'expression de GLG1 est revenue à la normale possiblement dû à la dégradation du siRNA. Donc l'effet du *knockdown* de GLG1 avec la technique de siRNA dure environ 72h et ne nous a pas permis d'évaluer l'effet de l'absence de GLG1 sur la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes qui prend 10 jours.

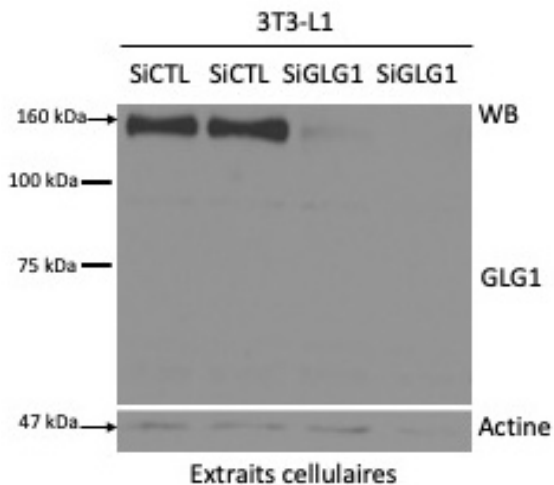


Figure 32 : Diminution de l'expression de GLG1 à l'aide d'un siRNA dans les cellules 3T3-L1
 Immunoblot avec anti-GLG1 et anti-actine sur des lysats des cellules 3T3-L1 72h après avoir été transfectées avec siGLG1 ou siCTL.

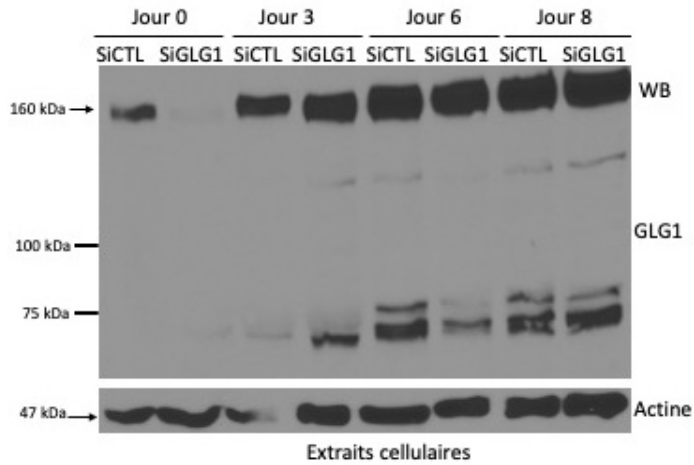


Figure 33 : Diminution de l'expression de GLG1 à l'aide d'un siRNA dans les cellules 3T3-L1 dure environ 72 heures

Immunoblot avec anti-GLG1 et anti-actine dans les lysat de cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes en présence d'un siGLG1 ou d'un siCTL à 50 nM pendant 8 jours (N=1).

Chapitre 5 : Discussion

5.1 Clivage de GLG1

L'hypercholestérolémie familiale est une maladie avec un fardeau important sur la santé des individus qui en souffrent. En effet, lorsque la maladie n'est pas traitée chez les hommes, ces derniers possèdent un risque de 50% d'avoir un événement coronarien fatal ou non-fatal avant l'âge de 50 ans. Chez les femmes, le risque est de 30% avant l'âge de 60 ans (212). Des études sur les causes du développement de la maladie ont abouti à l'identification de mutations se trouvant sur trois gènes différents soit celui de LDLR, d'apoB et de PCSK9 (119, 129, 130, 137). Cependant, l'étude de Marques-Pinheiro *et al.* a permis d'identifier un nouveau locus (HCHOLA4) impliqué dans le développement de l'HF. L'équipe de recherche a séquencé 57 gènes sur 154 gènes situés sur ce locus, mais aucun des gènes séquencés n'était le gène causal qui induit le développement de l'hypercholestérolémie (141). Le gène *GLG1* code pour une protéine de 160 kDa et se trouve sur le locus identifié par Marques-Pinheiro *et al.* Une étude menée dans notre laboratoire a permis de révéler une association entre la diminution de l'expression de GLG1 et la diminution des niveaux plasmatiques de PCSK9 qui est aussi un partenaire d'interaction de GLG1 (Samami *et al.*, en préparation). La diminution de l'expression de GLG1 est aussi associée à une diminution des niveaux plasmatiques de LDL-C, VLDL-C et de TG. Une autre étude effectuée dans notre laboratoire a montré la diminution des lésions athérosclérotiques au niveau du sinus aortique chez les souris hypercholestérolémiques avec un *knockdown* de GLG1 (Ardo *et al.*, en préparation). L'intérêt d'étudier GLG1 étant relativement récent, peu d'études ont été faites pour comprendre le mécanisme d'action de la protéine. Une étude par Antoine *et al.* a montré que GLG1 est clivée avant d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire (148). Sachant que le mécanisme d'action de la protéine est peu connu, l'objectif de notre étude était d'identifier les enzymes responsables de la protéolyse de GLG1 et l'effet du clivage de GLG1 sur le métabolisme des lipides.

Antoine *et al.* ont démontré que le clivage de GLG1 génère deux fragments de 150 kDa et de 55 kDa. Ils ont conclu que la protéine est clivée par les convertases de proprotéines, car il y a une inhibition de la sécrétion du fragment de 55 kDa de GLG1 en présence de decCMK, un inhibiteur des PCSK (148). Nous avons confirmé ces résultats lorsque nous avons traité des cellules avec decCMK et que nous avons obtenu une inhibition de la relâche du fragment de 55 kDa. Pour identifier la convertase de proprotéines qui est responsable de la protéolyse de GLG1, chacune des PCSK a été surexprimée avec GLG1 dans des cellules HEK293T. Lorsque les immunobuvardages à la Western ont été analysés, nos résultats ont démontré qu'aucune des PCSK n'était directement responsable du clivage de GLG1. Nos résultats contredisent alors ceux obtenus par l'équipe d'Antoine *et al.* Une limite de l'étude effectuée en 2009 est que leurs conclusions reposaient principalement sur l'inhibition de la relâche du fragment de 55 kDa de GLG1 en présence de decCMK sans déterminer l'enzyme responsable (148). Deux problèmes se posent alors, le premier est d'assumer que les convertases de proprotéines (PCSK1, PCSK2, Furine, PCSK4, PCSK5, PCSK6, PCSK7) ont les mêmes substrats puisqu'elles ont le même site de clivage soit $(R/K)X_n(R/K)\downarrow$ (170, 171). En effet, les PCSK partagent beaucoup de substrats, cependant, il peut y avoir des substrats spécifiques pour chaque PCSK. Par exemple, dans l'étude *in vivo* effectuée par Kim *et al.*, la furine est la seule protéine qui peut activer la sous-unité Ac45 de H^+ -ATPase dans les cellules pancréatiques β (213). Cet exemple montre que les PCSK ne clivent pas toutes les mêmes substrats. Il est donc important de déterminer la convertase de proprotéines qui peut cliver GLG1, ce que l'équipe d'Antoine *et al.* n'a pas étudié. Le deuxième problème est qu'ils n'ont pas considéré la diversification du protéome. En effet, les PCSK sont des enzymes protéolytiques qui peuvent activer et inactiver plusieurs protéines (169). L'inhibition par decCMK pourrait aussi indiquer qu'une PCSK active une enzyme qui à son tour clive GLG1. Cette théorie expliquerait aussi l'absence d'augmentation du clivage de GLG1 lors de la surexpression des PCSK. En effet, dans cette optique, l'enzyme responsable de la protéolyse de GLG1 n'étant pas surexprimée, cela ne favorise pas une augmentation du clivage de GLG1. Cependant, sachant qu'il y a une inhibition du clivage en présence de decCMK, mais pas d'effets de la surexpression des PCSK avec GLG1, il serait intéressant

de déterminer l'effet indirect que joue les PCSK sur le clivage de GLG1. Ce que nous avons fait en testant le rôle des MMP dont plusieurs sont activées par les PCSK.

Une limite importante de ces expériences est la normalisation des résultats. Puisque les analyses du fragment de GLG1 ont été effectuées dans le milieu, les résultats ne sont pas normalisés puisque qu'il n'y a pas de « *housekeeping gene* » tel que l'actine dans le milieu. Il serait alors intéressant de refaire les expériences et de normaliser les bandes obtenues avec la coloration au ponceau rouge (214). Cela pourrait apporter plus de précision sur la quantité relative du fragment de 55 kDa en présence de chaque PCSK.

Par la suite, nous avons identifié des sites de clivages des *trypsin-like* dans la structure primaire de GLG1. Étant de la famille des protéases à sérine, les sites de clivages des PCSK et des *trypsin-like* sont similaires soit (R/K) X_n (R/K) \downarrow et (R) ou (K) respectivement (170, 183). Les cellules HEK293T ont été incubées avec l'AEBSF et le Gabexate mesylate, des inhibiteurs des protéases à sérine. Ces deux inhibiteurs ciblent différents clans dans la famille des protéases à sérine, cependant, le clan commun pour les deux (AEBSF et Gabexate mesylate) est celui des protéases à sérine apparentées à la trypsine (*trypsin-like*). Les deux inhibiteurs ont inhibé la relâche du fragment de 55 kDa. Nous avons donc conclu que GLG1 est probablement clivée par les *trypsin-like*. De plus une étude menée par Chen et *al.* montre que la *trypsin-like* corine est clivée et activée par PCSK6 (230). Donc sachant que certaines PCSK peuvent activer des *trypsin-like* et sachant qu'il y a une inhibition de la sécrétion des fragments de 55 kDa avec les inhibiteurs des PCSK et des *trypsin-like.*, il serait pertinent d'étudier l'interaction des protéases à sérine apparentées à la trypsine en lien avec les différentes convertases de proprotéines .

À partir de la structure primaire de GLG1, Antoine *et al.*, ont identifié trois sites de clivages putatifs des PCSK soit aa423, aa578 et aa853, mais sans vérification expérimentale (148). Dans notre étude, la localisation du site de clivage était primordiale pour pouvoir muter le site spécifique et empêcher le clivage de GLG1. Nous nous sommes basés sur les trois sites déterminé dans l'étude d'Antoine *et al.* Cependant, la taille du fragment de 55 kDa a aussi été prise en considération, ce qui n'a pas été effectué dans

l'étude d'Antoine *et al.* En effet, un clivage de la protéine au site aa853 génèrerait un fragment d'approximativement 93 kDa à partir du N-terminal. Bref, les sites les plus probables ont été choisis en se basant sur trois critères, les sites de clivage des *trypsin-like*, les sites putatifs mentionnés dans l'article d'Antoine *et al.* et les sites pouvant générer un fragment de 55 kDa. Nous avons identifié les sites R423-R424, R453-K454 et R606-R607. Des mutations à ces trois sites en remplaçant R/K par des A (RR par AA ou RK par AA) n'ont pas empêché le clivage et la sécrétion du fragment de 55 kDa de GLG1. Donc, le site de clivage reste encore à déterminer. Puisque les *trypsin-like* clivent aux acides aminés basiques (164), il y a encore une vingtaine de possibilités qui se trouvent dans le segment de GLG1 qui pourraient correspondre au site qui génère le fragment de 55 kDa soit de l'acide aminé à la position 390 à l'acide aminé à la position 750. Il serait important de pouvoir muter le site de clivage de GLG1 pour pouvoir avoir la forme tronquée de la protéine et déterminer son effet sur le métabolisme des lipides plus particulièrement sur la sécrétion de l'apoB100 et de PCSK9.

Le fragment de 150 kDa de GLG1 a été observé et décrit dans l'article de Kôhl *et al.* et attribué au clivage de l'ectodomaine de la protéine (149). L'équipe a confirmé ces résultats dans l'étude menée par Antoine *et al.*, sans identifier l'enzyme responsable du clivage de l'ectodomaine (148). Nous nous sommes alors intéressés à l'identification de cette enzyme. Les principales enzymes responsables du clivage de l'ectodomaine sont les ADAMs (192). Puisque la famille des ADAMs est formée de plusieurs membres tel que ADAM10, ADAM12 et ADAM17, les cellules HEK293T ont été transfectées avec les TIMPs qui sont des inhibiteurs des ADAMs. Nous avons observé une inhibition du clivage de l'ectodomaine de GLG1 avec une absence de la sécrétion du fragment de 150 kDa dans le milieu extracellulaire en présence de TIMP3. De plus, le fragment de 55 kDa était aussi absent dans le milieu. Ceci indiquerait que GLG1 est clivée au site générant le fragment de 55 kDa après son relargage dans le milieu extracellulaire.

Sachant qu'il y a une inhibition du clivage générant le fragment de 150 kDa avec TIMP3, nous nous sommes concentrés sur ADAM10 et ADAM17, car ce sont les « *shedases* » inhibées par TIMP3 (192, 195). Cependant, ADAM17 était l'enzyme la plus

probable, car elle est seulement inhibée par TIMP3, alors que ADAM10 est aussi inhibée par TIMP1. L'expression d'ADAM17 a été diminuée avec des petits ARN interférents dans les cellules surexprimant GLG1-HA. Les diminutions de 50% et de 60% de l'expression d'ADAM17 n'ont pas empêché le clivage de l'ectodomaine. L'étude a une limitation et les résultats ne sont pas concluants, car il faudrait probablement une diminution de plus de 90% de l'expression de l'ARNm dans les cellules avant de voir un effet du *knockdown* d'ADAM17 tel que décrit dans l'étude de Patel *et al.* (215). Dans cette étude, il a été démontré qu'un *knockdown* de 90% d'ADAM17 est nécessaire pour avoir une diminution du clivage de l'ectodomaine de leur protéine d'intérêt (215). Une autre solution serait d'utiliser un inhibiteur sélectif d'ADAM 17 comme celui de Pfizer nommé PF-5480090 or PF-548 pour observer l'inhibition de la « *shedase* » sur le clivage de GLG1 (216, 217).

Nous avons remarqué deux nouveaux fragments apparaissant de façon aléatoire dans différentes conditions. Les fragments ont une taille de 130 kDa et de 45 kDa et le fragment de 45 kDa n'apparaît que lorsque le fragment de 130 kDa est présent dans le milieu de culture. Antoine *et al.*, ont montré que lorsque la protéine est déglycosylée et traitée avec la neuraminidase le plus grand fragment de 150 kDa est réduit à un fragment variant de 110 à 125 kDa (148). Cependant, le fragment de 45 kDa n'a pas été détecté dans leur étude. Pour élucider la provenance des fragments de 130 kDa et de 45 kDa, GLG1 a été déglycosylée avec la PNGase F qui cible les cinq sites N-glycosylés de la protéine. Après la déglycosylation de GLG1, quatre fragments de 137 kDa, de 117 kDa, de 50 kDa et de 37 kDa ont été détectés au lieu des fragments de 150 kDa, 130 kDa, 55 kDa et 45 kDa pour la protéine non déglycosylée. Puisque les tailles des fragments aléatoires et des fragments déglycosylés ne sont pas pareilles, cela nous a permis de conclure que les fragments de 130 kDa et de 45 kDa ne sont pas des fragments de 150 kDa et de 55 kDa non glycosylés. Il serait intéressant d'optimiser les conditions dans lesquelles ces deux fragments apparaissent, car ce fut très aléatoire. De plus, il serait important d'investiguer la raison pour laquelle il y a un nouveau fragment à 130 kDa et de déterminer si c'est dû au clivage de l'ectodomaine ou à un autre site de clivage des protéases à sérine apparentées à la trypsine. En ce qui concerne le fragment de 45 kDa, il est fort probablement dû au clivage du fragment de 130 kDa au même site de clivage des protéases à sérine apparentées

à la trypsine qui génère habituellement le fragment de 55 kDa, mais puisque le fragment de départ est plus petit soit 130 kDa par rapport au 150 kDa, alors le fragment clivé serait aussi plus petit. Cependant, cette hypothèse reste à confirmer.

Puisque les résultats du clivage sont obtenus dans un modèle *in vitro*, il fallait confirmer le clivage de GLG1 *in vivo*. Chez les souris C57BL/6 injectées avec AAV8-mGLG1-HA à 1×10^{11} VG/souris, les analyses des extraits de foie 19 jours post-injection ont révélé que les souris surexpriment la protéine de 160 kDa. Cependant, dans les plasmas, la protéine avec l'épitope HA n'était pas détectée. Une des limitations de cette étude est la concentration de la protéine avec l'épitope dans le plasma. La concentration de GLG1-HA plasmatique était probablement trop faible ou l'anticorps n'était pas efficace pour la détection de GLG1-HA sanguin par immunobuvardage ou par immunoprécipitation.

Le but de notre étude était aussi de déterminer l'effet du clivage de GLG1 sur le métabolisme des lipides. Sachant qu'une diminution de GLG1 provoque une diminution des niveaux plasmatiques de l'apoB (Samami *et al.*, en préparation), l'effet de la surexpression de GLG1 sur la sécrétion et l'expression d' apoB100 était importante à vérifier. Notre étude a montré qu'il n'y avait pas d'augmentation significative de l'expression ou de la sécrétion d'apoB48 ou d'apoB100. Cependant, il faudrait répéter cette expérience au moins 3 fois, car l'expression de GLG1-HA n'était pas assez élevée pour détecter un effet sur l'apoB100.

5.2 Différenciation des adipocytes

Durant les dernières décennies, une nouvelle épidémie s'est développée de façon importante dans le monde. Cette épidémie est l'obésité dont le nombre de personnes qui en souffre augmente surtout dans les pays développés (39, 41). L'obésité est associée à des comorbidités telles que l'athérosclérose, la dyslipidémie et le diabète (41). Cette dyslipidémie présente chez les personnes souffrant d'obésité est caractérisée par une augmentation des niveaux de LDL-C, de TG et d'acides gras libres avec une diminution des niveaux de HDL-C dans le plasma (41). L'obésité est aussi associée à une

augmentation des niveaux d'apoB, car le foie et l'intestin surproduisent les lipoprotéines qui contiennent apoB telles que VLDL et chylomicrons (41). La dyslipidémie associée à l'obésité est un des principaux prédicteurs du développement de maladies cardiovasculaires (41, 219).

GLG1 joue un rôle dans le métabolisme des lipides. Selon l'étude menée dans notre laboratoire GLG1 est associée à une diminution des niveaux plasmatiques de LDL-C, VLDL-C et de TG (Samami *et al.*, en préparation). Une étude effectuée par un collaborateur (article non-publié) a mis en lumière l'effet de l'absence de GLG1 chez les souris. En effet, les adipocytes de souris déficientes en GLG1 sont plus petits et plus nombreux que chez les souris de type sauvage. Une autre étude indique que les souris qui sont déficientes en GLG1 et qui survivent ont un poids et une taille plus petite que les souris de type sauvage (159). Connaissant ces deux rôles potentiels de GLG1, nous nous sommes questionnés sur son implication dans le développement de l'obésité. L'objectif de l'étude était de caractériser l'effet de GLG1 sur la différenciation des fibroblastes en adipocytes. Les cellules 3T3-L1 ont été différenciées en adipocytes et l'expression protéique et l'expression de l'ARN messager de GLG1 ont été mesurées. L'expression protéique relative de GLG1 était significativement augmentée par rapport au jour 0 à tous les jours analysés sauf au jour 8 et il y avait une augmentation de l'expression relative de l'ARNm qui n'était pas significative.

Notre étude a une limitation majeure qui est la variabilité importante entre les différents résultats. En effet, les résultats obtenus sont basés sur un petit nombre d'essais N=4 pour l'expression de l'ARNm et N=5 pour l'expression protéique. Ceci est un très petit nombre sachant que plusieurs erreurs peuvent survenir au cours de la différenciation. Par exemple, les milieux de différenciations utilisés qui contiennent le IBMX, le dexaméthasone et l'insuline sont préparés de nouveau entre chaque expérience. Les substances sont pesées avec précision, mais puisque les masses sont très faibles (tel que 3,92 mg pour le dexaméthasone), il pouvait y avoir des différences minimales ($\pm 0,05$ mg) entre chaque pesée et donc entre chaque différenciation. Ceci aurait pu avoir des effets sur l'efficacité de différenciation des fibroblastes en adipocytes. Une autre variable importante

est le fait que chaque différenciation provenait d'un nouvel aliquot de cellules 3T3-L1. Les aliquots contenaient des cellules avec un nombre de passage cellulaire différent, ce qui a un impact important sur la croissance et la division cellulaire des fibroblastes puisque la lignée des 3T3-L1 n'est pas immortalisée (220). Ces différences entre chaque expériences peuvent provoquer de la variabilité, ceci a été confirmé par l'expression de CD36, PPAR γ 2 et C/EBP α où la variabilité ne permettait pas d'avoir les augmentations qui sont connues dans la littérature (59, 66). En effet, l'expression protéique (CD36) ou de l'ARNm (PPAR γ 2 et C/EBP α) de ces marqueurs devrait augmenter significativement au cours de la différenciation (59). Pour compléter cette partie du projet, il serait pertinent de refaire plusieurs différenciations pour avoir un grand N pour diminuer la variabilité et avoir un profil exact de l'expression de GLG1 durant la différenciation. De plus, il serait pertinent de faire deux expériences en parallèle pour avoir des duplicatas pour chaque échantillon et avoir des résultats plus précis.

Finalement, durant cette partie de l'étude, nous avons pu confirmer les résultats obtenus dans l'étude de Miyaoka *et al.* qui indiquait que GLG1 et Pref-1 agissent de manière opposée (159). En effet, nous avons obtenu une diminution de l'expression relative de l'ARNm de Pref-1 et une augmentation de l'expression relative de l'ARNm de GLG1.

Un siRNA contre GLG1 a été utilisé dans les préadipocytes 3T3-L1 et son impact a été observé sur la différenciation qui avait duré huit jours. L'expression de GLG1 était absente au jour 0 (72h après la transfection). Cependant, à partir du jour 3 allant jusqu'au jour 8, l'expression de GLG1 remonte de nouveau. L'effet du siRNA de GLG1 n'a duré que 72h, ce qui indique que la technologie de siRNA n'est pas efficace et durable pour observer l'effet du *knockdown* de GLG1 pendant une différenciation des fibroblastes en adipocytes qui dure 10 jours. Une autre technologie simple et efficace à mettre en place pour modifier le génome de cellules de mammifères est la technologie de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) (207, 211). Une technique efficace pour transférer les fibroblastes 3T3-L1 est l'utilisation de lentivirus qui vont permettre de faire pénétrer Cas9 et l'ARN guide et d'effectuer des modifications génétiques (223). Nous pourrions préparer les CRISPR dans des lentivirus avec lesquels

nous pourrions infecter les cellules 3T3-L1. Les cellules exprimant les CRISPR seront ensuite sélectionnées avec la puromycine et analysées pour s'assurer de la suppression de l'expression de GLG1. Quatre plasmides CRISPR seront analysés pour pouvoir déterminer le plus efficace. Les ARN guides candidats seront déterminés à l'aide du logiciel du Broad Institute (*Genetic Perturbation Platform*) qui permet de classer les meilleurs cibles pour Cas9 avec le plus de probabilité d'obtenir le *knockout* de GLG1 dans le génome des souris. Lorsque le *knockout* de GLG1 sera confirmé dans les cellules 3T3-L1, une différenciation sera effectuée. Il serait important de pouvoir analyser par microscopie les gouttelettes lipidiques pour voir l'effet du *knockout* sur leur forme et leur quantité. De plus, la quantification des lipides sera aussi importante pour pouvoir comparer avec celle obtenue chez les cellules de type sauvage. Finalement, l'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation sera effectuée.

En conclusion, pour le premier objectif de cette étude, nous avons pu déterminer que le clivage de GLG1 est probablement causé par les protéases à sérine apparentées à la trypsine. Cependant, il faudra continuer à investiguer pour déterminer l'effet du clivage sur le métabolisme des lipides plus particulièrement sur l'expression et la sécrétion de l'apoB100, de LDLR et de PCSK9. De plus, il serait aussi intéressant d'étudier l'effet du mutant de GLG1 qui n'est pas clivé *in vivo* et de déterminer l'effet sur l'expression et la sécrétion de l'apoB100, tel qu'étudié avec la surexpression de GLG1-HA chez les souris C57BL/6. Ceci pourrait mettre en lumière l'importance du clivage de GLG1 sur le métabolisme des lipides.

Pour le deuxième objectif, les résultats obtenus ne sont pas concluants. En effet, le nombre d'échantillons et de différenciations pour pouvoir caractériser l'expression de GLG1 était faible et doit d'être plus élevé pour obtenir des données qui sont fiables et précises. Ceci pourrait être fait en parallèle avec la caractérisation de l'effet du *knockout* de GLG1 sur la différenciation des adipocytes grâce à la technologie de CRISPR.

Références bibliographiques

1. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1811(11):637-647. doi:10.1016/j.bbaliip.2011.06.009
2. Lipid Library (2020, 22 novembre). Lipid essentials. <https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=lipids/lipids.html>
3. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
4. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(3) :200-206. Doi :10.1097/MOL.0000000000000084
5. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res*. 1993;34(10):1637-1659.
6. Van Leeuwen EM, Emri E, Merle BMJ, Colijn JM, Kersten E, Cougnard-Gregoire A, Dammeier S, Meester-Smoor M, Pool FM, de Jong EK, Delcourt C, Rodriguez-Bocanegra E, Biarnés M, Luthert PJ, Ueffing M, Klaver CCW, Nogoceke E, den Hollander AI, Lengyel I. A new perspective on lipid research in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2018;67:56-86. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.04.006.
7. Britannica (2020, 22 novembre). Classification and formation. <https://www.britannica.com/science/lipid/Classification-and-formation>
8. Ferro CJ, Mark PB, Kanbay M, et al. Lipid management in patients with chronic kidney disease [published correction appears in *Nat Rev Nephrol*. 2019 Feb;15(2):121]. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(12):727-749. doi:10.1038/s41581-018-0072-9
9. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(6) :E1183-E1194. Doi :10.1152/ajpendo.90899.2008
10. Mansbach CM 2nd, Gorelick F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(4):G645-G650. Doi:10.1152/ajpgi.00299.2007.

11. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2004;303(5661):1201-1204. Doi:10.1126/science.1093131.
12. Li, P., Fu, Z., Zhang, Y. et al. The clathrin adaptor Numb regulates intestinal cholesterol absorption through dynamic interaction with NPC1L1. *Nat Med* 20, 80–86 (2014). <https://doi.org/10.1038/nm.3417>.
13. Blanchette-Mackie EJ. Intracellular cholesterol trafficking: role of the NPC1 protein. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1486(1):171-183. Doi:10.1016/s1388-1981(00)00055-x.
14. Mansbach CM, Siddiqi SA. The biogenesis of chylomicrons. *Annu Rev Physiol*. 2010;72 :315-333. Doi :10.1146/annurev-physiol-021909-135801
15. Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A. Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1300(3):151-170. Doi:10.1016/0005-2760(96)00041-0
16. Berriot-Varoqueaux N, Dannoura AH, Moreau A, et al. Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease. *Gastroenterology*. 2001;121(5):1101-1108. Doi:10.1053/gast.2001.29331
17. Dixon JB. Mechanisms of chylomicron uptake into lacteals. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1207 Suppl 1(Suppl 1):E52-E57. Doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05716.x
18. Randolph GJ, Miller NE. Lymphatic transport of high-density lipoproteins and chylomicrons. *J Clin Invest*. 2014;124(3):929-935. Doi:10.1172/JCI71610
19. Wolska A, Dunbar RL, Freeman LA, et al. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. *Atherosclerosis*. 2017;267:49-60. Doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.025
20. Mortimer BC, Beveridge DJ, Martins IJ, Redgrave TG. Intracellular localization and metabolism of chylomicron remnants in the livers of low density lipoprotein receptor-deficient mice and apoE-deficient mice. Evidence for slow metabolism via an alternative apoE-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1995;270(48):28767-28776. doi:10.1074/jbc.270.48.28767
21. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986, 232(4746):34-47. Review.
22. Burg JS, Espenshade PJ. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res*. 2011 ;50(4):403-10. Doi: 10.1016/j.plipres.2011.07.002.

23. DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res.* 2008;18(6):609-621. Doi:10.1038/cr.2008.61
24. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109(9):1125-1131. Doi:10.1172/JCI15593
25. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(12) :1695-1727. Doi :10.1515/cclm-2013-0358.
26. Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12(2) :151-157. Doi :10.1097/00041433-200104000-00008
27. Bayly, G.R. (2014). *Lipids and disorders of lipoprotein metabolism. Clinical Biochemistry: Metabolic and clinical aspects (3e éd., p. 702-736).* Churchill Livingstone.
28. Aalto-Setälä, K., Gylling, H., Helve, E. et al. Genetic polymorphism of the apolipoprotein B gene locus influences serum LDL cholesterol level in familial hypercholesterolemia. *Hum Genet* 82, 305–307 (1989). <https://doi.org/10.1007/BF00273986>.
29. Soufi M, Rust S, Walter M, Schaefer JR. A combined LDL receptor/LDL receptor adaptor protein 1 mutation as the cause for severe familial hypercholesterolemia. *Gene.* 2013;521(1):200-203. doi:10.1016/j.gene.2013.03.034
30. Lo Surdo P, Bottomley MJ, Calzetta A, Settembre EC, Cirillo A, Pandit S, Ni YG, Hubbard B, Sitlani A, Carfi A. Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep.* 2011 Dec 1;12(12):1300-5. Doi: 10.1038/embor.2011.205.
31. Goldstein JL, Dana SE, Faust JR, Beaudet AL, Brown MS. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem.* 1975;250(21):8487-8495.
32. Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D, et al. Lysosomal acid lipase deficiency—an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis.* 2014;235(1):21-30. Doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.003
33. Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, Galicia-Garcia U, Ostolaza H, Martin C. Validation of LDLr Activity as a Tool to Improve Genetic Diagnosis of

Familial Hypercholesterolemia: A Retrospective on Functional Characterization of LDLr Variants. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1676.

34. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 1995;36(2):211-228.

35. Wang S, Smith JD. ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *Biofactors.* 2014;40(6):547-554. Doi:10.1002/biof.1187

36. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med (Berl).* 2006;84(4):276-294. Doi:10.1007/s00109-005-0030-4

37. Ganesan LP, Mates JM, Cheplowitz AM, et al. Scavenger receptor B1, the HDL receptor, is expressed abundantly in liver sinusoidal endothelial cells. *Sci Rep.* 2016;6:20646. Doi:10.1038/srep20646

38. Russell DW. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl(Suppl):S120-S125. Doi:10.1194/jlr.R800026-JLR200

39. Obesity Canada (2020, 10 avril). Obesity In Canada. <https://obesitycanada.ca/obesity-in-canada/>

40. World Health Organization (2020,10 avril). Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

41. Klop B, Elte JW, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients.* 2013; 5(4):1218-40. Doi: 10.3390/nu5041218. Review.

42. Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol.* 2014;220(2):T47-T59. Doi:10.1530/JOE-13-0339

43. Tershakovec AM, Jawad AF, Stallings VA, Cortner JA, Zemel BS, Shannon BM. Age-related changes in cardiovascular disease risk factors of hypercholesterolemic children. *J Pediatr* 1998;132:414–20.

44. Krysiak R, Zmuda W, Okopien B. The effect of simvastatin-ezetimibe combination therapy on adipose tissue hormones and systemic inflammation in patients with isolated hypercholesterolemia. *Cardiovasc Ther.* 2014 Apr;32(2):40-6. doi: 10.1111/1755-5922.12057.

45. Aguilar D, Fernandez ML. Hypercholesterolemia induces adipose dysfunction in conditions of obesity and nonobesity. *Adv Nutr.* 2014;5(5):497-502. doi:10.3945/an.114.005934.

46. Akoumianakis I, Antoniades C. The interplay between adipose tissue and the cardiovascular system: is fat always bad?. *Cardiovasc Res.* 2017;113(9):999-1008. Doi:10.1093/cvr/cvx111
47. Ha EE, Bauer RC. Emerging Roles for Adipose Tissue in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(8):e137-e144. Doi:10.1161/ATVBAHA.118.311421
48. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 Dec 1;372(6505):425-32. doi: 10.1038/372425a0. Erratum in: *Nature* 1995;374(6521):479.
49. Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, Sattar N. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation.* 2001; 104(25):3052-6. doi: 10.1161/hc5001.101061.
50. Bodary PF, Gu S, Shen Y, Hasty AH, Buckler JM, Eitzman DT. Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(8):e119-22. doi: 10.1161/01.ATV.0000173306.47722.ec.
51. Spiroglou SG, Kostopoulos CG, Varakis JN, Papadaki HH. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2010; 17(2):115-30. doi: 10.5551/jat.1735.
52. Kim SR, Bae YH, Bae SK, Choi KS, Yoon KH, Koo TH, Jang HO, Yun I, Kim KW, Kwon YG, Yoo MA, Bae MK. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1783(5):886-95. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.004.
53. Zhong JC, Yu XY, Huang Y, Yung LM, Lau CW, Lin SG. Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 2007;74:388–395.
54. Hashimoto T, Kihara M, Imai N, et al. Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1705-1712. doi:10.2353/ajpath.2007.070471
55. Sowers JR. Obesity as a cardiovascular risk factor. *Am J Med.* 2003;115 Suppl 8A:37S-41S. doi:10.1016/j.amjmed.2003.08.012
56. Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G. Angiotensin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase

activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17450-17455. doi:10.1073/pnas.0604026103

57. Makoveichuk E, Vorrstö E, Olivecrona T, Olivecrona G. TNF- α decreases lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes by up-regulation of angiopoietin-like protein 4. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017; 1862(5):533-540. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.02.005.

58. Lefterova, M. I., and Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 107–114. doi: 10.1016/j.tem.2008.11.005

59. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(4):242-258. Doi:10.1038/s41580-018-0093-z

60. Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10(5):654-659. doi:10.1016/s0955-0674(98)80042-2 Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10(5):654-659. doi:10.1016/s0955-0674(98)80042-2

61. Akerblad P, Lind U, Liberg D, Bamberg K, Sigvardsson M. Early B-cell factor (O/E-1) is a promoter of adipogenesis and involved in control of genes important for terminal adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2002;22(22):8015-25.

62. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol*. 1999; 10(1):3-10. Review.

63. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2(4):236-240. doi:10.4103/2231-4040.90879

64. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998;78(3):783-809. Doi:10.1152/physrev.1998.78.3.783

65. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*. 1999 Feb;3(2):151-8. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80306-8.

66. Christiaens V, Van Hul M, Lijnen HR, Scroyen I. CD36 promotes adipocyte differentiation and adipogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jul;1820(7):949-56. Doi: 10.1016/j.bbagen.2012.04.001..

67. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41. Review.

68. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med.* 2001;5(4):378-387. Doi:10.1111/j.1582-4934.2001.tb00172.x
69. Lüscher, T.F. and Barton, M. (1997), *Biology of the Endothelium.* *Clinical Cardiology*, 20: II-3-II-10. <https://doi.org/10.1002/j.1932-8737.1997.tb00006.x>
70. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):III27-32. doi: 10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8.
71. Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* 2010;459(6):807-816. doi:10.1007/s00424-009-0765-9
72. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
73. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* 2010;62(3):525-563. doi:10.1124/pr.110.002907
74. Loscalzo J. Oxidative stress in endothelial cell dysfunction and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32(5-6):359-60. doi: 10.1159/000073600.
75. Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, Galicia-Garcia U, Ostolaza H, Martin C. Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11). Pii: E3426. Doi:10.3390/ijms19113426. Review.
76. Huang L, Chambliss KL, Gao X, Yuhanna IS, Behling-Kelly E, Bergaya S, Ahmed M, Michaely P, Luby-Phelps K, Darehshouri A, Xu L, Fisher EA, Ge WP, Mineo C, Shaul PW. SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis. *Nature.* 2019;569(7757):565-569. doi: 10.1038/s41586-019-1140-4.
77. Shapiro, M. D., & Fazio, S. (2017). Apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease. *F1000Research*, 6, 134. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9845>.
78. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2003;170(2):191-203. Doi:10.1016/s0021-9150(03)00097-2
79. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(11):2292-2301. Doi:10.1161/ATVBAHA.107.149179

80. Fatkhullina AR, Peshkova IO, Koltsova EK. The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81(11):1358-1370. Doi:10.1134/S0006297916110134
81. Zernecke A, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(4):742-750. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301655
82. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-326. doi:10.1089/jir.2008.0027
83. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*. 2000;247(3):349-358. Doi:10.1046/j.1365-2796.2000.00654.x
84. Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2012;1(1):60-74. doi:10.1177/2048872612441582
85. Patzelt J, Verschoor A, Langer HF. Platelets and the complement cascade in atherosclerosis. *Front Physiol*. 2015;6:49. doi:10.3389/fphys.2015.00049
86. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-95. doi: 10.1056/NEJMra043430. PMID: 15843671
87. Ball RY, Stowers EC, Burton JH, Cary NR, Skepper JN, Mitchinson MJ. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis*. 1995;114(1):45-54. doi: 10.1016/0021-9150(94)05463-s.
88. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):692-702. Doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306361
89. Ozge Sonmez, Mehmet Sonmez, Role of platelets in immune system and inflammation, *Porto Biomedical Journal*, Volume 2, Issue 6, 2017, Pages 311-314, ISSN 2444-8664, <https://doi.org/10.1016/j.pbj.2017.05.005>
90. Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:928315. doi:10.1155/2013/928315

91. Mika A, Macaluso F, Barone R, Di Felice V, Sledzinski T. Effect of Exercise on Fatty Acid Metabolism and Adipokine Secretion in Adipose Tissue. *Front Physiol.* 2019;10:26. doi:10.3389/fphys.2019.00026
92. Stefanick ML, Mackey S, Sheehan M, Ellsworth N, Haskell WL, Wood PD. Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol. *N Engl J Med.* 1998 Jul 2;339(1):12-20. doi: 10.1056/NEJM199807023390103..
93. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F. Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review. *Br J Nutr.* 2012;107 Suppl 2:S201-13. doi: 10.1017/S0007114512001596.
94. Davidson MH. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol.* 2006;98(4A):27i-33i. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.12.024.
95. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation.* 2000;101(2):207-213. Doi:10.1161/01.cir.101.2.207
96. Poirier S, Mayer G. The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:1135-1148. Doi:10.2147/DDDT.S36984
97. Gille A, Bodor ET, Ahmed K, Offermanns S. Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:79-106. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094746.
98. D. Maccubbin, H.E. Bays, A.G. Olsson, V. Elinoff, A. Elis, Y. Mitchel, et al. Lipid-modifying efficacy and tolerability of extended-release niacin/laropiprant in patients with primary hypercholesterolaemia or mixed dyslipidaemia *Int J Clin Pract.*, 62 (2008), pp. 1959-1970
99. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020 ;41(1):111-188. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455.
100. Rhainds D, Arsenault A.J., Tardif J.C. PCSK9 inhibition and LDL cholesterol lowering: the biology of an attractive therapeutic target and critical review of the latest clinical trials. *Clinical Lipidology.* 2012 ;7:6, 621-640
101. Giugliano RP, Sabatine MS. Are PCSK9 Inhibitors the Next Breakthrough in the Cardiovascular Field? *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(24):2638-2651. Doi:10.1016/j.jacc.2015.05.001. Review.

102. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;376(18):1713-1722. doi:10.1056/NEJMoA1615664
103. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, et al. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2097-2107. doi:10.1056/NEJMoA1801174
104. Crossey E, Amar MJA, Sampson M, Peabody J, Schiller JT, Chackerian B, Remaley AT. A cholesterol-lowering VLP vaccine that targets PCSK9. *Vaccine.* 2015;33(43):5747-5755. Doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.044.
105. Fitzgerald K, White S, Borodovsky A, Bettencourt BR, Strahs A, Clausen V, Wijngaard P, Horton JD, Taubel J, Brooks A, Fernando C, Kauffman RS, Kallend D, Vaishnav A, Simon A. A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N Engl J Med.* 2017; 376(1):41-51. Doi: 10.1056/NEJMoA1609243.
106. Wang N, Tall AR. A New Approach to PCSK9 Therapeutics. *Circ Res.* 2017;120(7):1063-1065. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310610.
107. Khan R, Spagnoli V, Tardif JC, L'Allier PL. Novel anti-inflammatory therapies for the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2015;240(2):497-509. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.783
108. Leung YY, Yao Hui LL, Kraus VB. Colchicine--Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum.* 2015;45(3):341-350. doi:10.1016/j.semarthrit.2015.06.013
109. Ridker PM, Howard CP, Walter V, et al. Effects of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation.* 2012;126(23):2739-2748. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.122556
110. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2019;381(26):2497-2505. doi:10.1056/NEJMoA1912388
111. Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2013;14(5):454-60. doi: 10.1038/ni.2550.
112. Martinez-Hervas, S. & Ascaso, F.A. (2018). *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (2e éd.). Elsevier Inc.

113. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2013;34(45):3478-90a. doi :10.1093/eurheartj/eh273
114. Benn M, Watts GF, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG. Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: screening of 98 098 individuals from the Copenhagen General Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *Eur Heart J*. 2016;37(17):1384-1394. Doi:10.1093/eurheartj/ehw028.
115. Moorjani S, Roy M, Gagné C, et al. Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Québec Province. *Arteriosclerosis*. 1989;9(2):211-216. Doi :10.1161/01.atv.9.2.211
116. Najam O, Ray KK. Familial Hypercholesterolemia: a Review of the Natural History, Diagnosis, and Management. *Cardiol Ther*. 2015;4(1):25-38. Doi :10.1007/s40119-015-0037-z
117. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, et al. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2014;35(32):2146-2157. Doi:10.1093/eurheartj/ehu274
118. Santos RD, Gidding SS, Hegele RA, et al. Defining severe familial hypercholesterolaemia and the implications for clinical management: a consensus statement from the International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel [published correction appears in *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016 Aug;4(8):e8]. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(10):850-861. Doi:10.1016/S2213-8587(16)30041-9
119. Lindgren V, Luskey KL, Russell DW, Francke U. Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(24):8567-8571. Doi:10.1073/pnas.82.24.8567
120. Bhatt DL, Steg PG, Miller M, Brinton EA, Jacobson TA, Ketchum SB, Doyle RT Jr, Juliano RA, Jiao L, Granowitz C, Tardif JC, Ballantyne CM; REDUCE-IT Investigators. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med*. 2019;380(1):11-22. doi: 10.1056/NEJMoa1812792. Epub 2018 Nov 10.

121. De Castro-Orós I, Pocoví M, Civeira F. The genetic basis of familial hypercholesterolemia: inheritance, linkage, and mutations. *Appl Clin Genet*. 2010;3:53-64.
122. Hobbs HH, Leitersdorf E, Goldstein JL, Brown MS, Russel DW. Multiple crm-mutations in familial hypercholesterolemia. Evidence for 13 alleles, including four deletions. *J Clin Invest*. 1988;81:909–917.
123. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, et al. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell*. 1984;39(1):27-38. Doi:10.1016/0092-8674(84)90188-0.
124. Lehrman MA, Schnedier WJ, Südhof TC, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science*. 1985;227:140–146.
125. Davis CG, Elhammer A, Russell DW, et al. Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J Biol Chem*. 1986;261:2828–2838.
126. Davis CG, van Driel IR, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The low density lipoprotein receptor. Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis. *J Biol Chem*. 1987;262(9):4075-4082.
127. Davis CG, Goldstein JL, Südhof TC, Anderson RG, Russell DW, Brown MS. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*. 1987;326(6115):760-765. Doi:10.1038/326760a0
128. Davidson NO, Shelness GS. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:169-93. Review.PubMed
129. Law SW, Lackner KJ, Hospattankar AV, et al. Human apolipoprotein B-100: cloning, analysis of liver mRNA, and assignment of the gene to chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(24):8340-8344. Doi:10.1073/pnas.82.24.8340
130. Bruikman CS, Hovingh GK, Kastelein JJP. Molecular basis of familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Cardiol*. 2017;32(3):262-266. doi: 10.1097/HCO.0000000000000385.
131. Varret M, Rabès JP, Saint-Jore B, et al. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet*. 1999;64(5):1378-1387. Doi:10.1086/302370ç

132. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(2):587-91.
133. Gaffney D, Reid JM, Cameron IM, Vass K, Caslake MJ, Shepherd J, Packard CJ. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(8):1025-9.
134. Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, Frost PH, Malloy MJ, Schumaker VN, Kane JP. Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest*. 1995;95(3):1225-34.
135. Nissen H, Hansen PS, Faergeman O, Hørder M. Mutation screening of the codon 3500 region of the apolipoprotein B gene by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Clin Chem*. 1995;41(3):419-23.
136. Benjannet S, Rhoads D, Essalmani R, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*. 2004;279(47):48865-48875. Doi:10.1074/jbc.M409699200
137. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34(2):154-156. Doi:10.1038/ng1161
138. Pisciotta L, Priore Oliva C, Cefalù AB, Noto D, Bellocchio A, Fresa R, Cantafora A, Patel D, Averna M, Tarugi P, Calandra S, Bertolini S. Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2006;186(2):433-40. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.015.
139. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2006;354(12):1264-72. doi: 10.1056/NEJMoa054013.
140. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*. 2005;37(2):161-5. doi: 10.1038/ng1509.
141. Marques-Pinheiro A, Marduel M, Rabès JP, Devillers M, Villéger L, Allard D, Weissenbach J, Guerin M, Zair Y, Erlich D, Junien C, Munnich A, Krempf M, Abifadel M, Jaïs JP; French Research Network on ADH, Boileau C, Varret M. A fourth locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps at 16q22.1. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(11):1236-42. Doi: 10.1038/ejhg.2010.94.

142. Willmroth F, Beaudet AL. Structure of the murine E-selectin ligand 1 (ESL-1) gene and assignment to Chromosome 8. *Mamm Genome*. 1999;10(11):1085-1088. Doi:10.1007/s003359901166
143. Burrus LW, Zuber ME, Lueddecke BA, Olwin BB. Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol*. 1992;12(12):5600-5609. Doi:10.1128/mcb.12.12.5600
144. Olofsson A, Hellman U, Ten Dijke P, et al. Latent transforming growth factor-beta complex in Chinese hamster ovary cells contains the multifunctional cysteine-rich fibroblast growth factor receptor, also termed E-selectin-ligand or MG-160. *Biochem J*. 1997;324 (Pt 2)(Pt 2):427-434. Doi:10.1042/bj3240427
145. Gonatas JO, Mourelatos Z, Stieber A, Lane WS, Brosius J, Gonatas NK. MG-160, a membrane sialoglycoprotein of the medial cisternae of the rat Golgi apparatus, binds basic fibroblast growth factor and exhibits a high level of sequence identity to a chicken fibroblast growth factor receptor. *J Cell Sci*. 1995;108 (Pt 2):457-467.
146. Mourelatos Z, Gonatas JO, Nycum LM, Gonatas NK, Biegel JA. Assignment of the GLG1 gene for MGF-160, a fibroblast growth factor and E-selectin binding membrane sialoglycoprotein of the Golgi apparatus, to chromosome 16q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 1995;28(2):354-355. Doi:10.1006/geno.1995.1156
147. The UniProt Consortium, UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue D1, 2019, D506–D515, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>.
148. Antoine M, Köhl R, Tag CG, Gressner AM, Hellerbrand C, Kiefer P. Secreted cysteine-rich FGF receptor derives from posttranslational processing by furin-like prohormone convertases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;382(2):359-64. Doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.026.
149. Köhl R, Antoine M, Olwin BB, Dickson C, Kiefer P. Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor alters secretion and intracellular routing of fibroblast growth factor 3. *J Biol Chem*. 2000;275(21):15741-8.
150. Steegmaier M, Borges E, Berger J, Schwarz H, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J Cell Sci*. 1997;110 (Pt 6):687-94.
151. Huang MC, Zollner O, Moll T, Maly P, Thall AD, Lowe JB, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1 are differentially modified by

fucosyltransferases Fuc-TIV and Fuc-TVII in mouse neutrophils. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31353-60.

152. Hidalgo A, Peired AJ, Wild M, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity.* 2007;26(4):477-489. Doi:10.1016/j.immuni.2007.03.011

153. Luo W, Wang H, Guo C, Wang J, Kwak J, Bahrou KL, Eitzman DT. Haploinsufficiency of E-selectin ligand-1 is associated with reduced atherosclerotic plaque macrophage content while complete deficiency leads to early embryonic lethality in mice. *Atherosclerosis.* 2012 Oct;224(2):363-7. Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.009.

154. Llaverias G, Noé V, Peñuelas S, et al. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318(1):265-274. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.021

155. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation.* 1999;100(25):2473-2476. Doi:10.1161/01.cir.100.25.2473

156. Yamamoto H, Kuroda N, Uekita H, et al. E-selectin ligand-1 (ESL-1) is a novel adiponectin binding protein on cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;470(2):425-430. Doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.023

157. Kapur NK, Musunuru K. Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(2):341-353. doi:10.2147/vhrm.s1653

158. Hou R, Goldberg AC. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: statins, ezetimibe, bile acid sequestrants, and combinations: comparative efficacy and safety. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2009;38(1):79-97. doi: 10.1016/j.ecl.2008.11.007.

159. Miyaoka Y, Tanaka M, Imamura T, Takada S, Miyajima A. A novel regulatory mechanism for Fgf18 signaling involving cysteine-rich FGF receptor (Cfr) and delta-like protein (Dlk). *Development.* 2010 Jan;137(1):159-67. Doi: 10.1242/dev.041574.

160. Yang T, Mendoza-Londono R, Lu H, et al. E-selectin ligand-1 regulates growth plate homeostasis in mice by inhibiting the intracellular processing and secretion of mature TGF-beta. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2474-2485. Doi:10.1172/JCI42150

161. Hudak CS, Sul HS. Pref-1, a gatekeeper of adipogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:79. Published 2013 Jul 3. Doi:10.3389/fendo.2013.00079

162. Yuhui Wang, Kyung-Ah Kim, Jung-Hyun Kim, Hei Sook Sul, Pref-1, a Preadipocyte Secreted Factor That Inhibits Adipogenesis, *The Journal of Nutrition*, Volume 136, Issue 12, December 2006, Pages 2953–2956, <https://doi.org/10.1093/jn/136.12.2953>
163. Page MJ, Di Cera E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Apr;65(7-8):1220-36. doi: 10.1007/s00018-008-7565-9. Review.
164. Di Cera E. Serine proteases. *IUBMB Life*. 2009 May;61(5):510-5. Doi: 10.1002/iub.186. Review.
165. Seidah NG, Prat A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(5):367-83. Review.
166. Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*. 2003;4(7):544-558. doi:10.1038/nrg1111
167. Long JZ, Cravatt BF. The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chem Rev*. 2011;111(10):6022-6063. Doi:10.1021/cr200075
168. Furuta M, Yano H, Zhou A, Rouillé Y, Holst JJ, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Furuta H, Steiner DF. Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 24;94(13):6646-51. doi: 10.1073/pnas.94.13.6646.
169. Choi S, Korstanje R. Proprotein convertases in high-density lipoprotein metabolism. *Biomark Res*. 2013;1(1):27. doi:10.1186/2050-7771-1-27
170. Seidah NG, Mayer G, Zaid A, et al. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(6-7):1111-1125. Doi:10.1016/j.biocel.2008.01.030
171. Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, et al. Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(4):1321-1326. Doi:10.1073/pnas.96.4.1321
172. Seidah NG, Chrétien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res*. 1999;848(1-2):45-62. Doi:10.1016/s0006-8993(99)01909-5.

173. Sakai J, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS. Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J Biol Chem.* 1998;273(10):5785-5793. Doi:10.1074/jbc.273.10.5785
174. Posner SF, Vaslet CA, Jurofcik M, Lee A, Seidah NG, Nillni EA. Stepwise posttranslational processing of progrowth hormone-releasing hormone (proGHRH) polypeptide by furin and PC1. *Endocrine.* 2004;23(2-3):199-213. Doi:10.1385/ENDO:23:2-3:199
175. Roebroek AJ, Umans L, Pauli IG, Robertson EJ, van Leuven F, Van de Ven WJ, Constam DB. Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development.* 1998 Dec;125(24):4863-76.
176. Wetsel WC, Rodriguiz RM, Guillemot J, et al. Disruption of the expression of the proprotein convertase PC7 reduces BDNF production and affects learning and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(43):17362-17367. Doi:10.1073/pnas.1314698110
177. Mitchell KJ, Pinson KI, Kelly OG, et al. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat Genet.* 2001;28(3):241-249. Doi:10.1038/90074
178. Mbikay M, Tadros H, Ishida N, et al. Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(13):6842-6846. Doi:10.1073/pnas.94.13.6842
179. Essalmani R, Hamelin J, Marcinkiewicz J, et al. Deletion of the gene encoding proprotein convertase 5/6 causes early embryonic lethality in the mouse. *Mol Cell Biol.* 2006;26(1):354-361. Doi:10.1128/MCB.26.1.354-361.2006
180. Constam DB, Robertson EJ. SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation. *Genes Dev.* 2000;14(9):1146-1155.
181. Zandberg WF, Benjannet S, Hamelin J, Pinto BM, Seidah NG. N-glycosylation controls trafficking, zymogen activation and substrate processing of proprotein convertases PC1/3 and subtilisin kexin isozyme-1. *Glycobiology.* 2011;21(10):1290-1300. Doi:10.1093/glycob/cwr060
182. Hurst LA, Bunning RA, Sharrack B, Woodroffe MN. siRNA knockdown of ADAM-10, but not ADAM-17, significantly reduces fractalkine shedding following pro-inflammatory cytokine treatment in a human adult brain endothelial cell line. *Neurosci Lett.* 2012;521(1):52-56. Doi:10.1016/j.neulet.2012.05.057

183. Goettig P, Brandstetter H, Magdolen V. Surface loops of trypsin-like serine proteases as determinants of function. *Biochimie*. 2019 Nov;166 :52-76. Doi : 10.1016/j.biochi.2019.09.004. Review.
184. Papazafiropoulou A, Tentolouris N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Hippokratia*. 2009;13(2):76-82.
185. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516. Doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.463
186. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39. Review.
187. Okada Y, Nagase H, Harris ED Jr. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J Biol Chem*. 1986 ;261(30):14245-55. PMID: 3095317.
188. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(12):a005058. doi:10.1101/cshperspect.a005058
189. Liu, S., Bae, Y., Yu, C. et al. Matrix metalloproteinase-12 is an essential mediator of acute and chronic arterial stiffening. *Sci Rep* 5, 17189 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep17189>
190. Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*. 2011;38(1):191-208. Doi:10.1183/09031936.00146510.
191. Chen EI, Kridel SJ, Howard EW, Li W, Godzik A, Smith JW. A unique substrate recognition profile for matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem*. 2002 Feb 8;277(6):4485-91.
192. Nagase H., Murphy G. (2008) Tailoring TIMPs for Selective Metalloproteinase Inhibition. In: Edwards D., Høyer-Hansen G., Blasi F., Sloane B.F. (eds) *The Cancer Degradome*. Springer, New York, NY
193. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol*. 2015;44-46:247-54. doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.005.
194. Chaturvedi P, Kalani A, Familtseva A, Kamat PK, Metreveli N, Tyagi SC. Cardiac tissue inhibitor of matrix metalloprotease 4 dictates cardiomyocyte

contractility and differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes: Road to therapy. *Int J Cardiol.* 2015;184:350-63. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.01.091.

195. Black RA. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(1):1-5. Review.

196. Demers A, Samami S, Lauzier B, Des Rosiers C, Ngo Sock ET, Ong H, Mayer G. PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(12):2517-25. Doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306032.

197. Poirier S, Samami S, Mamarbachi M, Demers A, Chang TY, Vance DE, Hatch GM, Mayer G. The epigenetic drug 5-azacytidine interferes with cholesterol and lipid metabolism. *J Biol Chem.* 2014;289(27):18736-51. Doi:10.1074/jbc.M114.563650.

198. Tebbenkamp AT, Crosby KW, Siemienski ZB, Brown HH, Golde TE, Borchelt DR. Analysis of proteolytic processes and enzymatic activities in the generation of huntingtin n-terminal fragments in an HEK293 cell model. *PLoS One.* 2012;7(12):e50750. Doi:10.1371/journal.pone.0050750

199. Shin JH, Yue Y, Duan D. Recombinant adeno-associated viral vector production and purification. *Methods Mol Biol.* 2012;798:267-284. Doi:10.1007/978-1-61779-343-1_15

200. Kumar S, Kang DW, Rezvan A, Jo H. Accelerated atherosclerosis development in C57Bl6 mice by overexpressing AAV-mediated PCSK9 and partial carotid ligation. *Lab Invest.* 2017 ;97(8):935-945. Doi: 10.1038/labinvest.2017.47. Epub 2017 May 15.

201. Lu H, Howatt DA, Balakrishnan A, Graham MJ, Mullick AE, Daugherty A. Hypercholesterolemia Induced by a PCSK9 Gain-of-Function Mutation Augments Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in C57BL/6 Mice-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(9):1753-1757. Doi:10.1161/ATVBAHA.116.307613

202. Akerblad P, Lind U, Liberg D, Bamberg K, Sigvardsson M. Early B-cell factor (O/E-1) is a promoter of adipogenesis and involved in control of genes important for terminal adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 2002 Nov;22(22):8015-25.

203. Tsuchiya M, Maeda A, Suzuki A, et al. Suppression of MafA mRNA with siRNA prevents adipose cell differentiation in 3T3-L1 cells. *Int J Mol Med.* 2009;23(6):725-732. Doi:10.3892/ijmm_00000186

204. Lee MS, Kim CT, Kim IH, Kim Y. Inhibitory effects of green tea catechin on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res.* 2009;23(8):1088-1091. Doi:10.1002/ptr.2737
205. Skrzypski M, T Le T, Kaczmarek P, et al. Orexin A stimulates glucose uptake, lipid accumulation and adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes and isolated primary rat adipocytes. *Diabetologia.* 2011;54(7):1841-1852. Doi:10.1007/s00125-011-2152-2
206. Karsenty J, Helal O, de la Porte PL, et al. I-FABP expression alters the intracellular distribution of the BODIPY C16 fatty acid analog. *Mol Cell Biochem.* 2009;326(1-2):97-104. Doi:10.1007/s11010-008-0004-2
207. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-2308. Doi:10.1038/nprot.2013.143
208. Zunke F, Rose-John S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(11 Pt B):2059-2070. Doi:10.1016/j.bbamcr.2017.07.001
209. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE Jr. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10(1):3-10. Review.
210. Tsuchiya M, Maeda A, Suzuki A, Yasuda K, Yoshida T, Nitta K, Tsuchiya K. Suppression of MafA mRNA with siRNA prevents adipose cell differentiation in 3T3-L1 cells. *Int J Mol Med.* 2009 ;23(6):725-32. doi: 10.3892/ijmm_00000186.
211. Boettcher M, McManus MT. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell.* 2015;58(4):575-85. doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.028.
212. Knowles JW, O'Brien EC, Greendale K, et al. Reducing the burden of disease and death from familial hypercholesterolemia: a call to action. *Am Heart J.* 2014;168(6):807-811. doi:10.1016/j.ahj.2014.09.001.
213. Kim W, Essalmani R, Szumska D, Creemers JW, Roebroek AJ, D'Orleans-Juste P, Bhattacharya S, Seidah NG, Prat A. Loss of endothelial furin leads to cardiac malformation and early postnatal death. *Mol Cell Biol.* 2012;32(17):3382-91. doi: 10.1128/MCB.06331-11.
214. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem.* 2010;401(2):318-20. doi: 10.1016/j.ab.2010.02.036.

215. Patel VB, Clarke N, Wang Z, et al. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;66:167-176. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.11.017
216. Caiazza F, McGowan PM, Mullooly M, et al. Targeting ADAM-17 with an inhibitory monoclonal antibody has antitumour effects in triple-negative breast cancer cells. *Br J Cancer.* 2015;112(12):1895-1903. doi:10.1038/bjc.2015.163
217. Shen M, Hu M, Fedak PWM, Oudit GY, Kassiri Z. Cell-Specific Functions of ADAM17 Regulate the Progression of Thoracic Aortic Aneurysm. *Circ Res.* 2018 ;123(3):372-388. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313181.
218. Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):614-24. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.08.002.
219. Franssen R, Monajemi H, Stroes ES, Kastelein JJ. Obesity and dyslipidemia. *Med Clin North Am.* 2011;95(5):893-902. doi: 10.1016/j.mcna.2011.06.003.
220. Ruiz-Ojeda FJ, Rupérez AI, Gomez-Llorente C, Gil A, Aguilera CM. Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1040. doi:10.3390/ijms17071040
221. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.* 1996;173(1 Spec No):33-8. doi: 10.1016/0378-1119(95)00685-0.
222. Walz W, Cayabyab FS. Neutrophil Infiltration and Matrix Metalloproteinase-9 in Lacunar Infarction. *Neurochem Res.* 2017;42(9):2560-2565. doi: 10.1007/s11064-017-2265-1..
223. Carlotti F, Bazuine M, Kekarainen T, Seppen J, Pognonec P, Maassen JA, Hoeben RC. Lentiviral vectors efficiently transduce quiescent mature 3T3-L1 adipocytes. *Mol Ther.* 2004;9(2):209-17. doi: 10.1016/j.ymthe.2003.11.021.
224. Lambert G, Sjouke B, Choque B, Kastelein JJ, Hovingh GK. The PCSK9 decade. *J Lipid Res.* 2012;53(12):2515-2524. doi:10.1194/jlr.R026658.
225. Zhu X, Zhou A, Dey A, Norrbom C, Carroll R, Zhang C, Laurent V, Lindberg I, Ugleholdt R, Holst JJ, Steiner DF. Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 ;99(16):10293-8. doi: 10.1073/pnas.162352599.

226. Berezin AE, Samura TA, Kremzer AA, Berezina TA, Martovitskaya YV, Gromenko EA. An association of serum vistafin level and number of circulating endothelial progenitor cells in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Metab Syndr*. 2016;10(4):205-212. doi: 10.1016/j.dsx.2016.06.008
227. Nam HJ, Gurda BL, McKenna R, Potter M, Byrne B, Salganik M, Muzyczka N, Agbandje-McKenna M. Structural studies of adeno-associated virus serotype 8 capsid transitions associated with endosomal trafficking. *J Virol*. 2011;85(22):11791-9. doi: 10.1128/JVI.05305-11.
228. Erba F, Fiorucci L, Pascarella S, Menegatti E, Ascenzi P, Ascoli F. Selective inhibition of human mast cell tryptase by gabexate mesylate, an antiproteinase drug. *Biochem Pharmacol*. 2001;61(3):271-6. doi: 10.1016/s0006-2952(00)00550-5.
229. Cortesi R, Ascenzi P, Colasanti M, Persichini T, Venturini G, Bolognesi M, Pesce A, Nastruzzi C, Menegatti E. Cross-enzyme inhibition by gabexate mesylate: formulation and reactivity study. *J Pharm Sci*. 1998;87(11):1335-40. doi: 10.1021/js980079u.
230. Chen S, Cao P, Dong N, et al. PCSK6-mediated corin activation is essential for normal blood pressure. *Nat Med*. 2015;21(9):1048-1053. doi:10.1038/nm.3920.
231. Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, Lam CW, Metreweli C, Celermajer DS. Effects of diet and exercise on obesity-related vascular dysfunction in children. *Circulation*. 2004;109(16):1981-6. doi: 10.1161/01.CIR.0000126599.47470.BE.
232. Yang J, Goldstein JL, Hammer RE, Moon YA, Brown MS, Horton JD. Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13607-12. doi: 10.1073/pnas.201524598.

Annexes

Annexe 1

Tableau I : Amorces pour la construction de pcDNA3.0-mGLG1-HA

pcDNA3.0-mGLG1-HA	Oligo	Séquence
PCR1	Sens (f)	5'TTAGAATTCATGGCGGTGTGTGGACGTGTACGG
	Anti-sens (r)	5'GGGACGTCGTATGGGTAGGCCCTGCTGCCGCGAG
PCR2	Sens (f)	5'ACGTCCCAGACTACGCGCAGAATGGTCACGGTCAGG
	Anti-sens (r)	5'TGATTGCAGTCTGAAGAAATCTC
PCR3	Sens (f)	5'TTAGAATTCATGGCGGTGTGTGGACGTGTACGG
	Anti-sens (r)	5' TGATTGCAGTCTGAAGAAATCTC

Tableau II : Liste des enzymes et numéro de catalogue

Enzyme	Compagnie	#Cat
SacI	New England BioLabs	#R0156S
SacII	New England BioLabs	#R0157S
AgeI	New England BioLabs	#R0552S
AgeI-HF	New England BioLabs	#R3552S
EcoRI	New England BioLabs	#R0101S
SbfI	New England BioLabs	#R0642S
AvrII	New England BioLabs	#R0174S
XbaI	New England BioLabs	#R0145S
XmaI	New England BioLabs	#R0180S
FseI	New England BioLabs	#R0588S
BsrBI	New England BioLabs	#R01025
PpuMI	New England BioLabs	#R0506S
XhoI	New England BioLabs	#R0146S
HindIII	New England BioLabs	#R0104S
BamHI	New England BioLabs	#R3136S
NheI	New England BioLabs	#R0131S
BbsI	New England BioLabs	#R3539

Tableau III : Concentration des différents inhibiteurs

Inhibiteur	Protéines inhibées	Conc.
Décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlorométhyl cétone (DecCMK)	PCSK	0 uM, 10 uM , 50 uM
4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)	Sérines protéases	0 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 1,0 mM
Gabexate mesylate	Sérine protéases apparentées à la trypsine	0 uM et 1 uM
Marimastat	Métalloprotéases	0 uM, 5 uM, 10 uM, 25 uM
GM6001	Métalloprotéases	0 uM, 10 uM, 50 uM

Tableau IV : Liste des inhibiteurs et numéro de catalogue

Inhibiteur	Compagnie	#CAT
Décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlorométhyl cétone (DecCMK)	Tocris	#3501
4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)	Sigma	#A8456
Gabexate mesylate	Sellerchem	#S2101
Marimastat	Cayman Chemical	#4869-1
GM6001	Millipore	#364206

Tableau V : Liste des plasmides de TIMP et numéro de catalogue

Plasmide TIMP	Exemples de Protéines inhibées	Compagnie	Clone ID	Antibiotique
pcDNA3.1-hTIMP1-DYK	ADAM10, MMP-8, MMP-9, MMP-10,	GenScript	OHu24051	Ampicilline
pcDNA3.1-hTIMP2-DYK	ADAM33, MMP-9, MMP-8 ADAMTS-4	GenScript	OHu16561D	Ampicilline
pcDNA3.1-hTIMP3-DYK	ADAM10 ADAM17 ADAM12 MMP-7, MMP-9, ADAMTS-2 ADAMTS-4	GenScript	OHu18861	Ampicilline
pcDNA3.1-hTIMP4-DYK	ADAM28, ADAM33, MMP-7, MMP-9	GenScript	OHu03267	Ampicilline

Tableau VI : Liste des siRNA et le numéro de catalogue

siRNA	#Cat	Compagnie
ON-TARGET plus SMARTpool Human ADAM17	#L-003453-00-0005	Dharmacon™
siGENOME SMARTpool human GLG1	#M-010597-01	Dharmacon™

Tableau VII : Séquence de siADAM17 humain

siADAM17	Séquence	#Cat
ON-TARGET plus SMARTpool Human ADAM17	GAAGAACACGUGUAAAUA	#J-003453-05
ON-TARGET plus SMARTpool Human ADAM17	GCACAAAGAAUUAUGGUAA	#J-003453-06
ON-TARGET plus SMARTpool Human ADAM17	UAUGGGAACUCUUGGAUUA	#J-003453-07
ON-TARGET plus SMARTpool Human ADAM17	GGAAAUAUGUCAUGUAUCC	#J-003453-08

Tableau VIII: Séquence de siGLG1 humain

siGLG1	Séquence	#Cat
siGENOME SMARTpool human GLG1	GAACACAGAUUACCGCUUA	#D-010597-01
siGENOME SMARTpool human GLG1	GACCAGAUCCGAAUCAUUA	#D-010597-02
siGENOME SMARTpool human GLG1	GGAUUGAGAUGUGGAGUUA	#D-010597-03
siGENOME SMARTpool human GLG1	UCUUAGAGCUGCAGUAUUU	#D-010597-04

Tableau IX : Séquence de siCTL

siCTL	Séquence	#Cat
siGENOME Non-Targeting siRNA pool#2	UAAGGUAUGAAGAGAUAC	#D-001206-14-20
siGENOME Non-Targeting siRNA pool#2	AUGUAUUGGCCUGUAUUAG	#D-001206-14-20
siGENOME Non-Targeting siRNA pool#2	AUGAACGUGAAUUGCUCAA	#D-001206-14-20
siGENOME Non-Targeting siRNA pool#2	UGGUUUACAUGUCGACUAA	#D-001206-14-20

Tableau X : Concentrations des anticorps primaires

Anticorps primaires	Anticorps secondaires	Compagnie	#cat.	Concentration
Anti-h/mGLG1	Anti- <i>mouse</i>	R&D systems	#MAB78791	1:200
Anti-GLG1	Anti- <i>rabbit</i>	Abgent	#AP9839b	1:2000
Anti-HA	Anti- <i>rabbit</i>	Sigma	#H6908	1:2000
Anti-V5-HRP	Pas de secondaire	Sigma-Aldrich	#V2260	1:5000
Anti-DDK	Anti- <i>mouse</i>	ORIGENE	#TA50022	1:2000
Anti-TIMP2	Anti- <i>rabbit</i>	Chris Overall		1:5000
Anti-TIMP3	Anti- <i>rabbit</i>	abcam	#Ab5939-50	1:5000
Anti-TIMP4	Anti- <i>rabbit</i>	abcam	#Ab11818	1:5000
Anti-Actine	Anti- <i>rabbit</i>	Sigma	#A2066	1:5000
Anti-CD36	Anti- <i>goat</i>	R&D systems	#AF2519	1:2000
Anti-mLDLR	Anti- <i>goat</i>	R&D systems	#AF2148	1:200
Anti-ApoB 2G11	Anti- <i>mouse</i>	Stephen Young et Ross Milnes (U de Ottawa) EMD millipore	#MABS2046	1:2000
Anti-Pancadhérine	Anti- <i>rabbit</i>	Life Technologies	#71-7100	1: 10000

Tableau XI : Concentrations des anticorps secondaires

Anticorps secondaires	Compagnie	#Cat.	Concentration
Anti-rabbit	SIGMA-Aldrich	A6154	1:10000
Anti-mouse	SIGMA-Aldrich	A6782	1:10000
Anti-goat	SIGMA-Aldrich	A5420	1:10000
Anti-Rabbit TrueBlot®	Rockland antibodies & assays	18-8816-33	1:1000
Alexa Fluor 647 anti-goat	Invitrogen	A21447	1:400
Alexa Fluor 555 anti-rabbit	Invitrogen	A31572	1:400

Tableau XII : Amorces de qPCR

Amorce	Séquence
GLG1 f	5'TCGGGATTGGAAGTTGGACC
GLG1 r	5'CCTCTGGACTTCAGCTCGAC
mTBP f	5'CCTAGTGGAGGTGCCTTG
mTBP_r	5'GGTTGCCACCTGAAGTCAGA
mHPRT f	5'CAGCGTCGTGATTAGCGATG
mHPRT_r	5'CAGAGGGCCACAATGTGATGG
mCEBP-beta f	5'GGTTCGGGACTTGATGCA
mCEBP-beta_r	5'CAACAACCCCGCAGGAAC
mCEBP-alpha f	5'AGGTGCTGGAGTTGACCAGT
mCEBP-alpha_r	5'CAGCCTAGAGARCCAGCGAC
mPrefl f	5'AAGTGTGTAAGTGCCTTG
mPrefl_r	5'TGCAAGCCCGAACGTCTATT
mPPAR γ_2 f	5'CGCTGATGCACTGCCTATGA
mPPAR γ_2 r	5'AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC
pAAV f	5'CCATGTTGGTCAGGCTCCTTA
pAAV_r	5'CTCTGCTCTCACTGCAGACC
pZAC-CMV f	5'CGCCATGTTGGCATTGA
pZAC-CMV_r	5'GTAACGCGGAACCTCCATA
BGH f	5'TGCCTTCCTTGACCCT
BGH_r	5'CCTTGCTGTCCTGCC
hADAM17 f	5'GTCTCTCCTATTCCCTGACCAGC
hADAM17_r	5'AGTCTGAGCAAAGAATCAAGC
hHPRT f	5'TGGCGTCGTGATTAGTGATG
hHPRT_r	5'CAGAGGGCTACAATGTGATGG
hTPB f	5'CGAATATAATCCCAAGCGGTTT
hTBP_r	5'GTGGTTCGTGGCTCTCTTATCC

Tableau XIII : Amorces des PCR pour les trois mutations R423-R424, R453-K454 et R606-R607

PCR/Mutant	Oligo	Séquence
PCR1/MutI*	A-1-Fwd-avant AgeI (f)	5'GCCAAATCCTGTAAGAGTGA CTTGAA
	A-1-Rev-mutI- Cg-Gc (r)	5'TCTTCCATCAGCATGGCTGCG TAATCCAGCATCTCAC
PCR2/MutI*	B-Fwd-MutI- Cg-Gc (f)	5'GTGAGATGCTGGATTACGCAG CCATGCTGATGGAAGA
	Rev-4200- SacII (r)	5'ATCTGACGCCCCGCGGCCAGGGGTGATGGCT
PCR3/MutI*	A-1-Fwd-avant AgeI (f)	5'GCCAAATCCTGTAAGAGTGA CTTGAA
	Rev-4200- SacII (r)	5'ATCTGACGCCCCGCGGCCAGGGGTGATGGCT
PCR1/MutII**	A-1-Fwd-avant AgeI (f)	5'GCCAAATCCTGTAAGAGTGA CTTGAA
	A-Mut-II-Rev- cg-aa-GC (r)	5'GAGGGTTCGCCCTGCCGCATGTAATCC AGAACAATGGT
PCR2/MutII**	B-Mut-II-F-cg- aa-GC (f)	5'ACCATTGTTCTGGATTACATGCGGCAG GGCGAACCCCTC
	Rev-4200- SacII (r)	5'ATCTGACGCCCCGCGGCCAGGGGTGATGGCT
PCR3/MutII**	A-1-Fwd-avant AgeI (f)	5'GCCAAATCCTGTAAGAGTGA CTTGAA
	Rev-4200- SacII (r)	5'ATCTGACGCCCCGCGGCCAGGGGTGATGGCT
PCR1/MutIII***	A-1-Fwd-avant AgeI (f)	5'GCCAAATCCTGTAAGAGTGA CTTGAA
	A-1-Rev- mutIII-Cg-Gc (r)	5'GACATTCTCGTGAGAGCGCCGCTCC TTGCTCTTCTGTGC
PCR2/MutIII***	B-Fwd-MutIII- Cg-Gc (f)	5'CCGCACAGAAGAGCAAGGAGCGG CGCTCTCACGAGAATGTC
	Rev-4200- SacII (r)	5'GCCAAATCCTGTAAGAGTGA CTTGAA
PCR3/MutIII***	A-1-Fwd-avant AgeI (f)	5'ATCTGACGCCCCGCGGCCAGGGGTGATGGCT
	Rev-4200- SacII (r)	5'GCCAAATCCTGTAAGAGTGA CTTGAA

*MutI: R423-R424 (Remplacer RR par AA)

**MutII : R453-K454 (Remplacer RK par AA)

*** MutIII : R606-R607 (Remplacer RR par AA)

Tableau XIV : Taille de chaque fragment PCR pour chaque mutation de GLG1

PCR/Mutant	TM/cycle	Taille
PCR1/MutI	55°C/30 cycles	182 pb
PCR2/MutI	61°C/30 cycles	2008 pb
PCR3/MutI	55°C/30 cycles	2153 pb
PCR1/MutII	57°C/30 cycles	270 pb
PCR2/MutII	62°C/30 cycles	1921 pb
PCR3/MutII	55°C/30 cycles	2153 pb
PCR1/MutIII	55°C/30 cycles	727 pb
PCR2/MutIII	63°C/30 cycles	1467 pb
PCR2/MutIII	55°C/30 cycles	2153 pb

Tableau XV : Séquence des shRNA de shGLG1 et shCTL

Nom	Séquence
shGLG1	5'TAACCCCTCACTAAAGGGACTCAAGCTTTTCCA AAAAAAAGTTAGAGTCCGAGGATATACCTCTTG AGTATATCCTCGGACTCTAACTCGGGATCCATCG AGCCCTATAGTGAGTCGTATT
shCTL (scramble, Addgene #plasmide 1864)	5' TAACCCTCACTAAAGGGACTCAAGCTTTTCCAA AAAACCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCTTGACGA GGGCGACTTAACCTTAGGCGGGATCCATCGAGCC CATAGTGAGTCGTATTA

Annexe 2

Solution 1 : Gel d'agarose 1%

- ◆ 0,5 g d'agarose-D1-LE (WISENT INC, 800-015-CG)
- ◆ 50 mL de TAE 1X
- ◆ 5 µL de 10 000X de SYBR® safe DNA gel stain (Invitrogen #S33102)

Solution 2: Gel d'agarose 0,8%

- ◆ 0,4 g d'agarose-D1-LE (WISENT INC, 800-015-CG)
- ◆ 50 mL de TAE 1X
- ◆ 5 µL de 10 000X de SYBR® safe DNA gel stain (Invitrogen #S33102)

Solution 3 : Tampon TAE 50X (pour utilisation diluer dans du H₂O distillée pour obtenir TAE 1X)

- ◆ 2M de Tris (BioShop #TRS001,5)
- ◆ 1M Acide acétique (Fisher Brand #351271-212)
- ◆ 50 mM de EDTA pH 8 (Fisher Scientific #BP118)
- ◆ Compléter avec de H₂O distillée jusqu'à 1L

Solution 4 : SOB

- ◆ 20 g Tryptone (Fisher Scientific, # BP1421)
- ◆ 5 g extrait de levure (Fisher Scientific, # BP1422)
- ◆ 0,5 g NaCl (VWR #7647-14-5)
- ◆ 2,5 mL chlorure de potassium (KCl, Sigma #P9541)

Solution 5 : Milieu SOC pour les bactéries (50 mL)

- ◆ 49 mL de SOB (Solution 4)
- ◆ 1 mL de glucose 1M (Sigma #G7021)
- ◆ 250 µL de Chlorure de Magnésium 1M (MgCl₂, Sigma #M1028)

Solution 6 : Milieu de culture bactérienne dans un pétri : DYT Agar (Stérilisé par avec autoclave)

- ◆ 3.5% tryptone (Fisher Scientific, #BP1421)
- ◆ 2.0% extrait de levure (Fisher Scientific, #BP1422)
- ◆ 0.5% NaCl (VWR #7647-14-5)
- ◆ 4,5 g Agar (Fisher Scientific, #BP1423)

Solution 7 : Bouillon de culture des bactéries: DYT (Stérilisé par avec autoclave)

- ◆ 3.5% tryptone (Fisher Scientific, # BP1421)
- ◆ 2.0% extrait de levure (Fisher Scientific, # BP1422)
- ◆ 0.5% NaCl (VWR #7647-14-5)

Solution 8 : RIPA 2X

- ◆ 100 mM Tris pH8 (BioShop #TRS001,5)
 - Acide chloridrique (HCl, Fisher Chemical # A144)
- ◆ 300 mM de NaCl (VWR #7647-14-5)
- ◆ 0,2% de Laurylsulfate de sodium (SDS, WISENT INC. #800-100-LG)
- ◆ 2% NP-40 (Millipore #492016)
- ◆ 0,5% Na deoxycholate (Fisher Scientific, # BP349)

Solution 9 : RIPA 1X (500 µL)

- ◆ 250 µL de RIPA 2X (Solution 8)
- ◆ 230 µL H₂O distillée
- ◆ 20 µL d'un inhibiteur de protéase 25X (ROCHE #11697498001)

Solution 10 : Laemmli 6X

- ◆ 300 mM Tris pH 6,8 (BioShop #TRS001,5)
 - Acide chloridrique (HCl, Fisher Chemical # A144)
- ◆ 600 mM de Dithiothreitol (DTT, Fischer BioReagents #BP172-5)
- ◆ 12% SDS (WISENT INC. #800-100-LG)
- ◆ 36% Glycerol (Sigma #G-7757)
- ◆ 10 mg/ml de Bleu de Bromophenol (BIO-RAD #161-0404)

Solution 11 : Tampon de chargement 6X (Orange G)

- ◆ 60% glycerol (Sigma #G-7757)
- ◆ 60 mM Éthylènediaminetétraacétique pH 8 (EDTA, Fisher Scientific #BP118)
- ◆ 60 mM Tris-HCL pH 8 (BioShop #TRS001,5)
- ◆ 0,05% Orange G (Sigma #O-3756)

Solution 12 : Gel de séparation de polyacrylamide 8 % pour SDS-PAGE (pour 8 mL)

- ◆ 3,7 mL de H₂O distillée
- ◆ 2,13 mL 30% acrylamide/bis 29:1 (BIO-RAD #161056)
- ◆ 2 mL de 1,5 M Tris pH 8,8 (BioShop #TRS001,5)
 - Acide chloridrique (HCl, Fisher Chemical # A144)
- ◆ 80 µL de 10 % SDS (WISENT INC. #800-100-LG)
- ◆ 80 µL de 10% Persulfate d'ammonium (APS, Fischer BioReagents # BP179)
- ◆ 8 µL TEMED (Invitrogen # 15524-010)

Solution 13 : Gel de séparation de polyacrylamide 15 % pour SDS-PAGE (pour 8 mL)

- ◆ 1,8 mL de H₂O distillée
- ◆ 4 mL 30% acrylamide/bis 29:1 (BIO-RAD #161056)
- ◆ 2 mL Tris pH 8,8 (BioShop #TRS001,5)
 - Acide chloridrique (HCl, Fisher Chemical # A144)
- ◆ 80 µL de 10 % SDS (WISENT INC. #800-100-LG)
- ◆ 80 µL de 10% Persulfate d'ammonium (APS, Fischer BioReagents # BP179)
- ◆ 8 µL TEMED (Invitrogen # 15524-010)

Solution 14 : Gel de concentration 4 % pour SDS-PAGE (pour 5 mL)

- ◆ 3,4 mL de H₂O distillée
- ◆ 830 µL 30% acrylamide/bis 29:1 (BIO-RAD #161056)
- ◆ 630 µL Tris pH 6,8 (BioShop #TRS001,5)
 - Acide chloridrique (HCl, Fisher Chemical # A144)
- ◆ 50 µL de 10 % SDS (WISENT INC. #800-100-LG)
- ◆ 50 µL de 10% Persulfate d'ammonium (APS, Fischer BioReagents # BP179)
- ◆ 5 µL TEMED (Invitrogen # 15524-010)

Solution 15 : Tampon de Migration 10X (Dilué à 1X avec de H₂O distillée)

- ◆ 4 L de H₂O distillée
- ◆ 250 mM de Tris (BioShop #TRS001,5)
- ◆ 1,92 M de Glycine (BioShop #GLN002,5)
- ◆ 1% SDS (WISENT INC. #800-100-LG)

Solution 16 : Tampon de Transfert 10X

- ◆ 4 L de H₂O Nanopure
- ◆ 250 mM de Tris (BioShop #TRS001,5)
- ◆ 1,92 M de Glycine (BioShop #GLN002,5)

Solution 17 : Tampon de transfert à 1X

- ◆ 800 mL de methanol (MeOH, Fisher Chemicals #A452-4)
- ◆ 400 mL de tampon de transfert 10X (Solution 16)
- ◆ 2,8 L de H₂O Nanopure

Solution 18 : Ponceau rouge

- ◆ 0,2% Ponceau S (Fisher scientific #BP103)
- ◆ 1% acide acétique (Fisher Brand #351271-212)

Solution 19 : TTBS 20X

- ◆ 121,1 g de Tris (BioShop #TRS001,5)
- ◆ 175,3 g de NaCl (VWR #7647-14-5)
 - Ajuster le pH à 7,5 avec HCl (Fisher Chemical # A144)
- ◆ 10 mL de TWEEN-20%
- ◆ Compléter avec de H₂O distillée jusqu'à 1 L

Solution 20 : TTBS 1X

- ◆ 19 L de H₂O distillée
- ◆ 1 L de TTBS 20X (Solution 19)

Solution 21 : Tampon de lyse pour Virus AAV8

- ◆ 3 mL de NaCl 5M (VWR #7647-14-5)
- ◆ 5 mL de Tris, pH 8,5 (1M) (BioShop #TRS001,5)
- ◆ 92 mL de H₂O distillée

Solution 22 : PBS 10X

- ◆ 800 mL de H₂O distillée
 - ◆ 80 g NaCl (VWR #7647-14-5)
 - ◆ 2 g KCl (Sigma #P9541)
 - ◆ 14,4 g Hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄, Fisher Scientific #S374-1)
 - ◆ 2,4 g de dihydrogénophosphate de sodium (NaH₂PO₄, Fisher Scientific #S69-1)
- Ajuster le pH à 7,4 avec HCl (Fisher Chemical # A144)
Stériliser avec l'autoclave

Solution 23 : 5X PBS-MK

- ◆ 250 mL de PBS 10X
 - ◆ 2,5 mL de KCl (Sigma #P9541)
 - ◆ 2,5 mL MgCl₂ (
 - ◆ 500 mL de H₂O
- Filtrer avec un filtre de 0,2 um (PALL life science #4652)

Solution 24 : Iodixanol gradient solutions

	25%	40%*	60%
Optiprep 60 (mL)	50	68	100
5X PBS-MK	24	20	-
Phenol Red 0.5% (µL)	300	-	250
H₂O (mL)	46	12	-
Total (mL)	120	100	100

Filtrer avec un filtre de 0,2 um (PALL life science #4652)

- ◆ Optiprep Density Gradient medium (Sigma #D156)
- ◆ Phenol-Red (Bishop #PHE600.5)

Solution 25 : Gradient d'iodixanol (ordre précis)

- ◆ 1 ml d'iodixanol 60% (Solution 24)
- ◆ 1 ml d'iodixanol 40% (Solution 24)
- ◆ 1 ml d'iodixanol 25% (Solution 24)

Solution 26 : 10 % TWEEN

- ◆ 1 mL TWEEN 20 (Fisher BioReagents #BP337)
- ◆ 9 mL de H₂O distillée

Solution 27 : Solution de nettoyage des virus

- ◆ 450 mL de H₂O distillée
- ◆ 50 mL de PBS 10X
- ◆ 50 µL de 10 % TWEEN (Fisher BioReagents #BP337)

Solution 28 : Solution Stock de PBS pour la microscopie

- ◆ 190 ml de solution A (NaH_2PO_4 0,2M)
 - 27,6 g de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4 , Fisher Scientific #S69-1)
 - 1000 mL de H_2O distillée
- ◆ 810 ml de Solution B (Na_2HPO_4 , 0,2 M)
 - 28,4 g Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4 , Fisher Scientific #S374-1)
 - 1000 mL de H_2O distillée
- ◆ 1000 mL de H_2O distillée

Solution 29 : PBS pour la microscopie

- ◆ 400 mL de solution stock (Solution 28)
- ◆ 3 600 mL de H_2O distillée
- ◆ 30 g NaCl (VWR #7647-14-5)

Solution 30 : Paraformaldéhyde 3,5%

- ◆ 2,2 mL de Paraformaldéhyde 16 % (Electron Microscopy science # 15710)
- ◆ 8,8 mL de PBS microscopie

Solution 31 : Albumine de sérum bovin 1% (BSA)

- ◆ 0,4 g BSA (Roche #10 735 086 001)
- ◆ 40 mL de PBS microscopie
- ◆ Filtrer avec filtre 0,2 μm (PALL #4652)

Solution 32 : 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI)

- ◆ 0,5 μL de DAPI 5 mg/ml (Invitrogen #D1306)
- ◆ 10 ml de PBS microscopie

Solution 33 : 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) 5%

- ◆ 2 g de DABCO (ACROS #112470250)
- ◆ 4 mL de PBS pour la microscopie
- ◆ Complété jusqu'à 40 mL avec glycérol (Sigma #G7757)