

2m11.2950.2

Université de Montréal

**Localisation ultrastructurelle et rôle du MTP
(Microsomal Triglyceride Transfer Protein) dans l'intestin.**

par

Isabelle Slight

Département de Nutrition

Faculté de médecine

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

Novembre, 2001

© Isabelle Slight, 2001



QU
145
U58
2002
V.003

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Localisation ultrastructurelle et rôle du MTP
(Microsomal Triglyceride Transfer Protein) dans l'intestin.

présenté par :
Isabelle Slight

a été évalué par un jury composé des suivantes :

Dr Victor C. Gavino
(président du jury)

Dr Emile Levy
(directeur de recherche)

Dre Guylaine Bouchard
(membre du jury)

Mémoire accepté en : Avril 2002

Sommaire

La complexité du transport intestinal des graisses est conférée par la multitude de mécanismes biochimiques impliqués dans la digestion et l'absorption des lipides alimentaires par l'intestin. Suite à la digestion de ces dernières, les produits lipolytiques franchissent la barrière microvillositaire et sont acheminés vers le réticulum endoplasmique (RE) où l'assemblage des lipoprotéines, principalement les chylomicrons, prend place. La formation de ces véhicules lipidiques nécessite la présence de l'apolipoprotéine (apo) B, une protéine structurale du chylomicron ainsi que celle du MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein), participant clef pour l'assemblage et l'exocytose des particules lipoprotéinémiques. Cette protéine cruciale de 97 kDa doit être complexée à un autre peptide de 58 kDa, le PDI (Protein Disulfide Isomerase), pour conserver son activité de transfert des lipides au niveau du RE. Cependant, sa localisation dans d'autres compartiments intracellulaires demeure énigmatique. D'après diverses études expérimentales, il est raisonnable de stipuler que l'hétérodimère ne serait pas exclusivement confiné au niveau du RE, mais il serait également localisé dans d'autres compartiments intracellulaires impliqués dans la voie de biogenèse des lipoprotéines. De plus, la co-localisation du MTP et du PDI dans d'autres organelles suggérerait que le complexe protéique pourrait conserver son activité dans ces différents sites.

Le but premier de cette étude est donc d'établir la distribution du MTP et du PDI dans les organelles subcellulaires de l'entérocyte et de déterminer si la large sous-unité du MTP est associée au PDI et à l'apolipoprotéine B. Le second objectif vise principalement à examiner l'expression du MTP et du PDI ainsi que l'activité du complexe protéique dans les sites où il se distribue. Nous avons ainsi élaboré trois stratégies expérimentales afin de définir si le MTP et le PDI jouent un rôle additionnel dans la voie de synthèse et d'excrétion des lipoprotéines intestinales.

Une étude morphologique, réalisée par microscopie électronique utilisant l'immunocytochimie et le complexe protéine A/or, a permis de révéler la topographie du complexe MTP dans la cellule intestinale. La localisation de cet hétérodimère a été observée au niveau des microvillosités, du RE, de l'appareil de Golgi et de la membrane basolatérale. De plus, la détection immunocytochimique en doublet a

dévoilé la co-localisation partielle du MTP et du PDI dans chacun des compartiments étudiés. Le contact spatial étroit existant entre le MTP et l'apo B dans le Golgi a également été démontré. Ces données morphologiques ont été ensuite confirmées par Western blot et par des études fonctionnelles en comparant le niveau d'expression et d'activité de ces deux sous-unités dans le Golgi et les membranes apicales. Le complexe a été détecté et l'activité vérifiée dans le Golgi isolé de rat et dans les microvillosités préparées à partir de cellules Caco-2 (modèle cellulaire intestinal), de jéjunum humain, de rat, de chien, de porc et de lapin. Les résultats des études morphologiques, biochimiques et fonctionnelles laissent supposer un rôle important du MTP dans ces deux subdivisions cellulaires. D'autre part, le traitement des cellules Caco-2 avec la colchicine et le nocodazole, deux inhibiteurs de l'activité des microtubules, bloque l'apparition du complexe MTP au niveau de la bordure en brosse. La présence d'un cytosquelette intact semble donc essentiel au transport des vésicules contenant le MTP vers la membrane apicale. Bien que le marquage du complexe MTP-PDI est décelé dans la membrane basolatérale, son absence au niveau des lipoprotéines plasmatiques indique que l'hétérodimère n'est pas sécrété hors de l'entérocyte. Sur la base de ces données, il est possible de supposer que le MTP accompagne, telle une chaperon, la lipoprotéine jusqu'à la membrane basolatérale où elle est libérée dans la circulation sanguine.

En conclusion, ces résultats suggèrent que le RE ne constitue pas la seule organelle où se localise le MTP et le PDI, mais ce complexe est également présent dans d'autres compartiments. Son rôle ne se limiterait donc pas à l'assemblage et au transport des lipoprotéines, mais il contribuerait aussi à d'autres fonctions spécifiques à sa localisation intracellulaire.

Mots clés : intestin, lipoprotéine, MTP, PDI, membrane apicale, membrane basolatérale, appareil de Golgi, cytosquelette, apolipoprotéine B.

Abstract

Intestinal lipoproteins, mainly chylomicrons (CM), constitute the main vehicle for the transport of dietary lipids into the blood circulation. Their synthesis is initiated in the endoplasmic reticulum (ER) and requires the presence of apolipoprotein (apo) B, a structural protein of CM, and MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein), a key participant into the assembly and secretion of CM particles. This crucial 97 kDa protein must be associated with a second 58 kDa peptide, known as the multifunctional Protein Disulfide Isomerase (PDI), in order to keep its full activity in the ER. However, its localization in cellular compartments remains uncertain. According to diverse studies, one could stand to reason that the protein complex would not exclusively be confined in the ER, but would also be localized in other subcellular compartments involved in the biogenesis of lipoproteins. Moreover, the colocalization of MTP and PDI subunits in other organelles could suggest that the heterodimer could preserve its activity in those different sites.

The major objective of this study was to establish the distribution of MTP and PDI within subcellular organelles of small intestine epithelial cells and determine if the 97 kDa subunit is associated with PDI and apo B. Using a high-resolution immunogold approach, with specific polyclonal antibodies, MTP was revealed in various subcellular compartments. The localization of the heterodimer was observed in the ER, villi, Golgi apparatus and basolateral membrane. Furthermore, double immunocytochemical detection unravelled the colocalization of MTP and PDI in these same intracellular compartments as well as the interaction between MTP and apo B in the Golgi. In a second step, we compared the expression level and activity of MTP in the Golgi and brush border membrane. The MTP protein mass and its activity were detected in the villi isolated from Caco-2 cells, as well as in the intestinal specimens of human, rat, dog, swine and rabbit. A substantial triglyceride transfer activity was also shown in the Golgi fractions isolated from rats. These results suggest an important role for MTP in these two compartments. The Caco-2 cells were also treated with nocodazole and colchicines, which block the appearance of MTP in apical membrane, indicating that intracellular trafficking of MTP requires an intact microtubular network. Despite the visualization of MTP-PDI staining in the basolateral membrane, we confirmed that MTP is not secreted with lipoproteins.

According to these data, one could suppose that MTP acts as a chaperone, accompanying the CM to the basolateral membrane, which would facilitate its secretion into the blood circulation.

In conclusion, the occurrence of membrane-associated apo B in the Golgi, coupled with its interaction with active MTP, indicates a major role for the Golgi in the biogenesis of apo B-containing lipoproteins. Moreover, these results provide the first evidence that MTP and PDI are colocalized in subcellular compartments other than the ER. Therefore, it is possible that its role is not restricted to the assembly of lipoproteins, but it could also contribute to other functions specific to its intracellular distribution.

Key words: intestine, lipoproteins, MTP, PDI, brush border membrane, basolateral membrane, Golgi apparatus, cytoskeleton, apolipoprotein B.

Table des matières

Sommaire	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Listes des sigles et abréviations	xi
Dédicace	xiii
Chapitre 1: Introduction	1
1. Lipides alimentaires et absorption intestinale	2
1.1 Lipides diététiques	3
1.2 Phase digestive	8
1.2.1 Processus intra-gastrique	8
1.2.2 Processus intra-luminal	9
1.3 Phase intracellulaire	11
1.3.1 Captation et réestérification des produits lipolytiques de l'entérocyte	11
1.3.2 Composition, formation et sécrétion des lipoprotéines intestinales	14
1.4 Métabolisme des lipoprotéines intestinales	19
2. MTP: une protéine clef pour l'assemblage et l'exocytose des lipoprotéines intestinales	22
2.1 Désordre métabolique associé à une déficience génétique du MTP...	22
2.2 Assemblage des lipoprotéines intestinales	24
2.2.1 Synthèse et sécrétion de l'apolipoprotéine B	24
2.2.2 Rôle du MTP dans l'assemblage des lipoprotéines intestinales ...	28
2.2.2.1 Implication du MTP dans la 1 ^{ère} étape de lipidation de l'apolipoprotéine B	29
2.2.2.2 Implication du MTP dans la 2 ^{ième} étape de lipidation de l'apolipoprotéine B	31
2.2.3 Inhibiteurs du MTP dans le traitement de l'hyperlipidémie	34
2.3 Structure protéique et génétique du complexe MTP	35

2.3.1 Structure hétérodimérique	35
2.3.2 Structure tertiaire de la large sous-unité du MTP	39
2.3.3 Caractéristiques de la cavité du MTP liant et transportant les lipides	41
2.3.3.1 Les propriétés de transport des lipides du MTP	41
2.3.3.2 Les sites de liaison aux lipides du MTP	42
2.3.4 Interaction entre la large sous-unité du MTP et le PDI	43
2.3.5 Les sites de liaison à l'apolipoprotéine B du MTP	45
2.3.6 Les polymorphismes du MTP	47
3. Régulation du MTP au niveau de l'entérocyte	50
3.1 Lipides alimentaires	50
3.2 Insuline	54
3.3 Cytokines et endotoxine	55
3.4 Éthanol	56
4. Objectifs de l'étude	59
Chapitre 2 : Articles	61
1. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons	62
2. Identification of microsomal triglyceride transfer protein in intestinal brush- border membrane	103
Chapitre 3: Discussion	147
Présence du complexe MTP-PDI au niveau de l'appareil de Golgi	148
Présence du complexe MTP-PDI au niveau de la membrane basolatérale	151
Présence du complexe MTP-PDI au niveau de la membrane apicale	152
Bibliographie	157
Remerciements	174

Liste des tableaux

Tableau I	Principales classes d'acides gras.....	4
Tableau II	Classification et propriétés des lipoprotéines plasmatiques.....	18
Tableau III	Caractéristiques du Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP).....	36
Tableau IV	Régulation du Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) et de l'apolipoprotéine B.....	51

Liste des figures

Figure 1 Structure des triglycérides.....	5
Figure 2 Structure des phospholipides.....	6
Figure 3 Structure du cholestérol.....	7
Figure 4 Structure du chylomicron.....	15
Figure 5 Voie de synthèse et d'excrétion des lipoprotéines intestinales.....	20
Figure 6 Modèles de biogenèse et de dégradation intracellulaire de l'apo B...	27
Figure 7 Organisation du gène de la large sous-unité du MTP.....	38
Figure 8 Organisation du gène du PDI.....	39
Figure 9 Diagrammes de la cavité liant les lipides de la lipovitelline (LV) et du MTP.....	40
Figure 10 Régulation du MTP et de l'apo B.....	58
Figure 11 Rôle possibles du complexe MTP-PDI dans l'entérocyte.....	156

Liste des sigles et abréviations

ABL: abetalipoprotéinémie
ACAT : acyl-CoA cholestérol acyltransférase
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AG : acide gras
AP-1: activator protein 1
apo A-I: apolipoprotéine A-I
apo A-II: apolipoprotéine A-II
apo A-IV: apolipoprotéine A-IV
apo B : apolipoprotéine B
apo C-I : apolipoprotéine C-I
apo C-II: apolipoprotéine C-II
apo C-III : apolipoprotéine C-III
apo E : apolipoprotéine E
ARNm: acide ribonucléique messenger
CCK : cholécystokinine
CE : cholestérol ester
CETP : cholesteryl ester transfer protein
CM : chylomicron
DAG : diacylglycérol
ERE: ethanol repression element
FABP: fatty acid binding protein
HDL: high density lipoprotein
HF: hypercholestérolémie familiale
HNF-1: hepatic nuclear factor 1
HNF-4: hepatic nuclear factor 4
Hsp 70: heat shock protein 70
IL-1: interleukine 1
IL-6: interleukine 6
KDa: kilodalton
LCAT: lécithine: cholesterol-acyltransférase

LPS: lipopolysaccharide
LysoPC: lysophosphatidylcholine
M: molaire
MAG : monoacylglycérol
min: minute
ml: millilitre
mM: milli molaire
MTP : microsomal triglyceride transfer protein
nm : nanomètre
PC : phosphatidylcholine
PDI : protein disulfide isomerase
PE : phosphatidyl-éthanolamine
PI : phosphatidyl-inositol
PL : phospholipide
PS : phosphatidyl-sérine
RE : réticulum endoplasmique
REL : réticulum endoplasmique lisse
RER : réticulum endoplasmique rugueux
SCP : sterol carrier protein
sec : seconde
SRE : sterol regulatory element
SREBP : sterol regulatory element binding protein
TAG/TG : triacylglycérol/triglycéride
TNF- α : Tumor necrosis factor- α
 μ Ci: microcurie
 μ g: microgramme
 μ l: microlitre
VLDL: very low density lipoprotein
WHHL: watanabe-heritable-hyperlipidemic

Je dédie ce mémoire à Patrick, en reconnaissance de son soutien moral, de ses encouragements constants, mais plus encore, pour son amour inconditionnel.

Chapitre 1 : Introduction

1. Lipides alimentaires et absorption intestinale

L'intérêt actuel suscité par les effets des lipides alimentaires sur la santé s'explique en grande partie par le lien qui a été établi entre la consommation accrue d'acides gras saturés et de cholestérol et l'augmentation du risque de maladies coronariennes. Au Canada et aux États-Unis, les maladies cardiovasculaires ont engendré une grande inquiétude puisqu'elles sont responsables d'un taux élevé de mortalités dont un grand nombre de décès prématurés (28). Il n'est pas étonnant de constater que la nutrition devienne l'une des préoccupations centrales de nos sociétés occidentales puisque ces dernières sont bien reconnues pour leur alimentation caractérisée par des apports nutritionnels déséquilibrés. Entre autre, les lipides diététiques représentent une source calorique importante dans la plupart de ces civilisations soit environ 35-50% de la prise calorique quotidienne totale (150 g/j) alors que les apports quotidiens recommandés ne devraient pas excéder plus de 30% des calories totales (116).

L'attention particulière portée à l'alimentation et à la santé cardiovasculaire a renouvelé un grand intérêt quant aux rôles de l'intestin grêle en tant que participant actif dans l'absorption des lipides et dans le métabolisme des lipoprotéines. Un grand pas a été fait dans la compréhension de la coordination des mécanismes impliqués dans l'absorption intestinale des graisses diététiques, fonction essentielle et grandement développée chez les mammifères. L'évolution marquée des fonctions du système digestif en l'occurrence, le processus d'assemblage des lipoprotéines intestinales, semble compenser l'apport accru de lipides diététiques observé dans l'alimentation occidentale (29).

1.1) Lipides diététiques

Les lipides ont, en nutrition humaine, une complexité à la mesure de leur importance. Des progrès remarquables ont été réalisés quant à l'acquisition de connaissances sur leurs rôles physiologiques. Leurs effets sur les lipides plasmatiques sont actuellement mieux connus. Des incertitudes persistent, mais les données actuelles permettent de confirmer les apports conseillés et de mieux établir la place et la répartition des matières grasses dans l'alimentation (77).

Les lipides diététiques procurent une source d'énergie importante pour l'organisme puisqu'ils apportent 9 Cal/g consommé et doivent fournir 30% de l'apport énergétique total quotidiennement. Cette contribution est non seulement primordiale pour maintenir l'intégrité des structures cellulaires et par conséquent, des fonctions de la membrane, mais représente une source d'acides gras essentiels pour la synthèse des écosanoïdes, des prostaglandines et des leucotriènes. D'autre part, les propriétés biologiques des lipoprotéines plasmatiques sont influencées par l'ingestion de lipides alimentaires (77). En somme, ces différentes fonctions physiologiques accomplies par les graisses diététiques sont essentielles au maintien de l'homéostasie de l'organisme.

Les lipides se caractérisent par une grande diversité de structure et de fonction. Ils sont classés en divers groupes selon leur capacité d'interagir avec les milieux aqueux (49). Les lipides non polaires ne sont pas hydrosolubles. Parmi cette classe, on retrouve le cholestérol ester (CE), les triacylglycérols (TAG), les diacylglycérols (DAG), et les acides gras (AG) à longue chaîne non ionisés. Quant aux lipides amphipatiques, comportant à la fois des groupes polaires et non polaires, ils possèdent la propriété d'interagir avec les surfaces aqueuses en formant des micelles où les lipides non polaires sont orientés vers le centre de la structure alors que les lipides polaires font face au milieu aqueux. On retrouve dans cette classe les monoacylglycérols (MAG), les acides gras ionisés et les phospholipides (PL) (116).

Parmi les différents types de lipides alimentaires, les acides gras forment la classe qui possède la structure la plus simple (tableau I). Ce sont des composés organiques formés d'une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue qui présente un groupement méthyle (-CH₃) et un groupement carboxyle (-COOH). On a identifié plus de 100 types différents d'acides gras et ils se distinguent par la longueur de leur queue carbonée, par leur degré d'insaturation et par la position des liaisons doubles au sein de la chaîne hydrocarbonée. Les acides gras dépourvus de liaison double sont dits saturés et ceux qui en portent au moins une sont des acides gras insaturés. Parmi ces derniers, ceux qui portent une seule liaison double sont dits mono-insaturés, tandis que ceux qui en portent plus d'une sont qualifiés de poly-insaturés (49).

Tableau I. Principales classes d'acides gras

Nom commun	Nom systématique	Code	Formule
Acides gras saturés			
acide butyrique	acide butanoïque	C4 : 0	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH
acide caproïque	acide hexanoïque	C6 : 0	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH
acide caprylique	acide octanoïque	C8 : 0	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH
acide caprique	acide décanoïque	C10 : 0	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH
acide laurique	acide dodécanoïque	C12 : 0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH
acide myristique	acide tétradécanoïque	C14 : 0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH
acide palmitique	acide hexadécanoïque	C16 : 0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
acide stéarique	acide octadécanoïque	C18 : 0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
acide arachidique	acide eicosanoïque	C20 : 0	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH
acide behénique	acide docosanoïque	C22 : 0	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH
Acides gras insaturés			
acide palmitoléique	acide 9-hexadécaénoïque	C16 : 1, n-7 cis	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
acide oléique	acide 9-octadécaénoïque	C18 : 1, n-9 cis	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
acide élaïdique	acide 9-octadécaénoïque	C18 : 1, n-9 trans	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
acide linoléique	acide 9,12-octadécadiénoïque	C18 : 2, n-6,9 cis	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
acide α-linolénique	acide 9,12,15-octadécatriénoïque	C18 : 3, n-3,6,9 cis	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
acide γ-linolénique	acide 6,9,12-octadécatriénoïque	C18 : 3, n-6,9,12 cis	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=HCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₄ COOH
acide columbinique	acide 5,9,12-octadécatriénoïque	C18 : n-6, 9 cis, n-13 trans	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=HCH ₂ CH=CHCH ₂ CH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH
acide eicosénoïque	acide 11-eicosénoïque	C20 : 1, n-9 cis	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₉ COOH
acide erucique	acide 13-docosaénoïque	C22 : 1, n-9 cis	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₁₁ COOH
acide brassidique	acide 13-docosaénoïque	C22 : 1, n-9 trans	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₁₁ COOH
acide nervalique	acide 15-tétracosénoïque	C24 : 1, n-9 cis	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₁₃ COOH
acide dihomog-γ-linolénique	acide 8, 11, 14-eicosatétraénoïque	C20 : 3, n-6, 9, 12 cis	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=HCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₆ COOH
acide arachidonique	acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque	C20 : 4, n-6, 9, 12, 15 cis	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=HCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH

(adaptée de Shills et al. 1999)

Les acides gras sont des constituants de nombreux types de lipides. En plus de fournir une source majeure de combustible pour le métabolisme cellulaire, les acides gras sont en général mis en réserve sous forme de lipides complexes soit les triacylglycérols (figure 1). Ce sont des composés formés de trois résidus d'acides gras estérifiés au glycérol, un alcool à trois carbones. Ce sont des lipides neutres et non polaires. Le caractère hydrophobe des triacylglycérols entraîne leur agglomération en gouttelettes de graisses à l'intérieur des cellules (49).

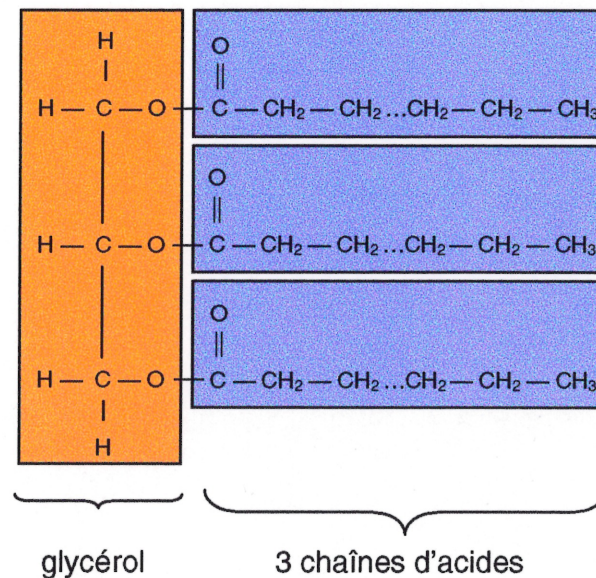


Figure 1. Structure des triglycérides (adaptée de Marieb 1999)

Bien que les triacylglycérols forment la classe de lipide majoritairement retrouvée chez les mammifères, ils ne font pas parti des constituants de la bicouche lipidique, infrastructure typique des membranes biologiques. Les lipides prépondérants de ces membranes sont les glycérophospholipides (phosphoglycérides) élaborés sur un squelette de glycérol-3-phosphate. Comme ces composés contiennent un groupement phosphate, on les classe parmi les phospholipides (figure 2). Ce sont des lipides formés de glycérol lié à deux acides gras et à un composant non lipidique. On distingue quatre principaux types de phospholipides dans les membranes biologiques soit la phosphatidyl-éthanolamine, la phosphatidyl-sérine, la phosphatidyl-choline ainsi que la sphingomyéline. Ces

molécules amphipatiques possèdent une tête polaire et une longue queue non polaire (49).

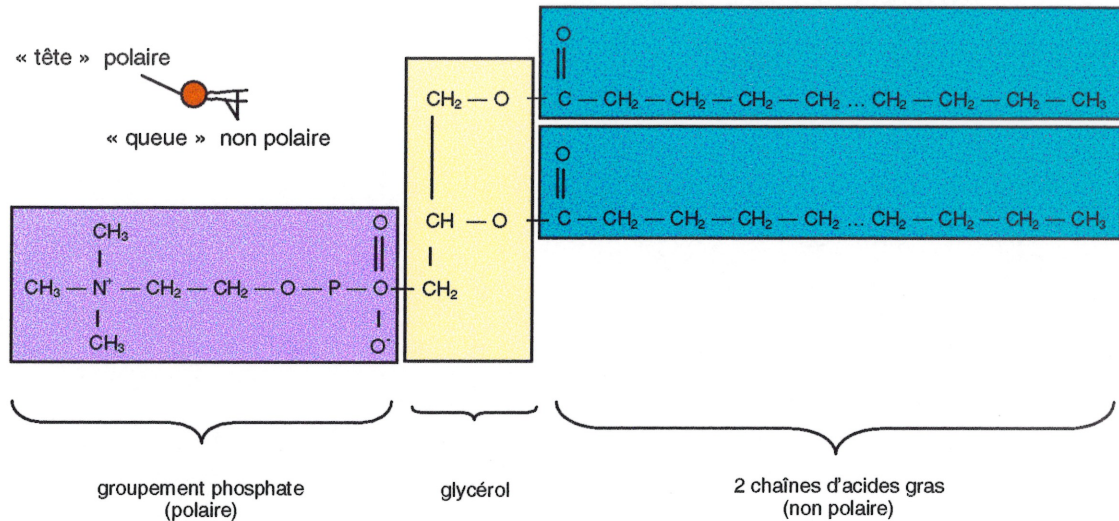


Figure 2. Structure des phospholipides (adaptée de Marieb 1999)

La dernière catégorie de lipides alimentaires, bien représentée dans les membranes biologiques, est celle des stéroïdes. Ils appartiennent au grand groupe des composés polyprényles, synthétisés à partir d'une molécule à cinq carbones, l'isoprène. On les reconnaît à leur quatre cycles fusionnés. Le cholestérol est un stéroïde très bien connu d'une part, pour son rôle essentiel dans la constitution des membranes biologiques où il sert à moduler la fluidité et d'autre part, joue son rôle comme précurseur des hormones stéroïdiennes et des sels biliaires (figure 3). L'estérification du groupe hydroxyle en position C-3 du cholestérol par les acides gras produit des esters de cholestérol, molécules encore plus hydrophobes que le cholestérol lui-même (49).

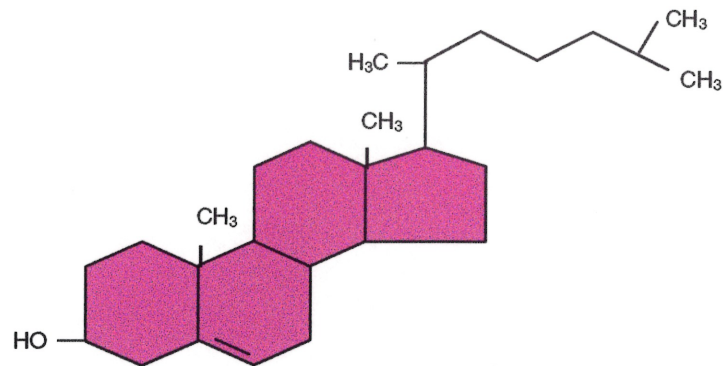


Figure 3. Structure du cholestérol (adaptée de Marieb 1999)

Les triacylglycérols représentent la catégorie de lipides diététiques majeure et ils contribuent à plus de 90% des calories totales provenant des lipides soit 150 g/jour. Par contre, l'apport diététique en phospholipides (principalement la phosphatidylcholine) est constitué seulement de 1 à 2 g/jour. Quant au cholestérol (principalement sous forme de cholestérol libre), sa source alimentaire est principalement d'origine animale. Cependant, on peut également retrouver le cholestérol dans les plantes et certains légumes (avoine, pomme de terre) et ce jusqu'à 20 à 25% des stérols totaux diététiques (116).

Les aliments sont indispensables à l'organisme puisqu'ils constituent la source d'énergie de toutes réactions chimiques et biologiques de l'organisme et fournissent les matériaux nécessaires à la formation de nouveaux tissus corporels ou la réparation de ces derniers. Cependant, les aliments doivent subir une multitude de transformations biochimiques avant de pouvoir être absorbés et transférés à la circulation pour subvenir aux besoins énergétiques de l'organisme. Les organes impliqués dans ces différentes étapes de transformation et de dégradation des aliments forment le système digestif (115).

1.2) Phase digestive

La fonction la plus importante du tractus gastro-intestinal est de transformer l'énergie provenant de l'alimentation de façon à ce qu'elle soit utilisable et disponible pour l'organisme. Les lipides diététiques ingérés sont partiellement digérés dans l'estomac. Cependant, la majeure partie de l'hydrolyse enzymatique de ces macromolécules alimentaires se déroule dans l'intestin grêle. Il est non seulement le principal organe de la digestion, mais aussi la partie du système digestif qui assure l'absorption des nutriments et leur transport vers le système circulatoire (20). Les lipides doivent ainsi subir, avant d'être absorbés, une digestion enzymatique accomplie en deux phases soit, l'une intra-gastrique et l'autre intraluminaire (22).

1.2.1) Processus intra-gastrique

La digestion lipidique débute dans l'estomac où l'état physique des lipides est transformé sous l'action de la lipase gastrique. Les mouvements de brassage de l'estomac favorisent l'émulsion des graisses qui est essentielle avant l'hydrolyse enzymatique. L'étape clef de la stabilisation de l'émulsion lipidique est l'interaction des gouttelettes de triacylglycérols avec la phosphatidylcholine alimentaire ainsi que les fragments protéolytiques résultant de la digestion peptidique. La masse de triacylglycérols est séquestrée dans le cœur de l'émulsion et existe en tant que phase homogène huileuse. Cette conformation permet aux triacylglycérols d'être continuellement exposés aux lipases pour leur digestion en diacylglycérol et en acide gras par l'échange rapide qui se produit entre le cœur et la surface de l'émulsion de triglycérides. Conséquemment au pH acide retrouvé dans l'estomac, tous les acides gras libérés demeurent protonés et avec les diacylglycérols, ils se dissolvent dans la phase huileuse de l'émulsion de triglycérides (29). Cette activité lipolytique préduodénale joue un rôle important dans la digestion des triacylglycérols puisqu'elle compense l'absence de la lipase pancréatique chez le nouveau-né (66).

La lipolyse gastrique diffère en plusieurs points de la lipolyse intestinale. D'abord, la lipase préduodénale a une activité optimale à un pH variant entre 4 et 5,5 alors que l'activité des lipases pancréatiques est optimale à un pH alcalin. De plus, la lipase gastrique peut briser les trois liens esters établis entre les acides gras et la molécule de glycérol tandis que la lipase pancréatique ne peut libérer que 2 acides gras, le troisième restant lié au glycérol. La lipase préduodénale demeure résistante aux enzymes protéolytiques comme la pepsine et ne requièrent pas de cofacteur comme la colipase dans le cas de la lipase pancréatique. Finalement, les produits lipolytiques gastriques majeurs sont les diacylglycérols et les acides gras alors que la lipase pancréatique réduit les diacylglycérols pour libérer des monoacylglycérols et des acides gras (29).

1.2.2) Processus intra-luminal

L'émulsion lipidique pénètre dans l'intestin grêle, au niveau du duodénum, sous forme de fines gouttelettes de lipide d'un diamètre inférieur à 0,5 μm . Le pH acide du chyme entrant dans le duodénum déclenche la libération, par la paroi intestinale, de la sécrétine. Cette hormone active la sécrétion d'ions carbonates et d'eau par le pancréas afin de neutraliser l'acidité du chyme. La cholécystokinine (CCK) est ensuite sécrétée ce qui incite la vésicule biliaire à se contracter et à déverser la bile dans le duodénum. Cette hormone déclenche également la sécrétion d'enzymes pancréatiques telles que la lipase pancréatique, la phospholipase A_2 et la cholestérol estérase. La combinaison d'un pH alcalin, des ions Ca^{2+} , de sels biliaires, de la phosphatidylcholine et d'enzymes lipolytiques apporte un changement marqué de la forme physique et chimique de l'émulsion lipidique et initie une cascade d'événements (29).

Les propriétés détergentes des acides gras, des phospholipides et des sels biliaires permettent la dispersion des gouttelettes de lipides ce qui augmente grandement leur surface d'exposition, étape nécessaire à leur hydrolyse par les enzymes pancréatiques (22). Ce phénomène est appelé émulsification. Le pH du duodénum à l'entrée de l'émulsion lipidique favorise la perte des protons des acides gras. Ils deviennent ainsi ionisés ce qui leur permet de migrer à la surface de

l'émulsion de triglycérides où ils contribuent à y fixer la colipase, cofacteur essentiel à l'action de la lipase pancréatique (29). Cette dernière, représentant 2 à 3 % des protéines totales du jus pancréatique, agit sur les triacylglycérols en libérant des monoacylglycérols et des acides gras. La digestion des phospholipides s'effectue uniquement dans l'intestin grêle puisque la lipase gastrique n'est pas capable de les digérer. Leur hydrolyse par la phospholipase A_2 produit des acides gras et de la lyso-phosphatidylcholine (116). Quant aux esters de cholestérol, ils sont séquestrés dans le cœur huileux de l'émulsion de triglycérides et doivent subir une hydrolyse de leur lien ester par l'action de la cholestérol estérase afin d'être absorbés sous forme de cholestérol libre. Les sels biliaires sont une composante essentielle de cette réaction servant en tant que cofacteur primordial et comme véhicule pour une solubilisation efficace des stérols extrêmement hydrophobes (29).

Les sels biliaires sont indispensables à la digestion des lipides et leur propriété amphiphile leur permet de former des micelles lorsqu'ils atteignent une concentration critique. À ces amas moléculaires viennent s'unir les produits lipolytiques (AG, MAG, lysoPC,) pour former des micelles mixtes. Celles-ci sont primordiales au passage des lipides à travers le milieu aqueux de la lumière intestinale et de la couche aqueuse non agitée qui recouvre la bordure en brosse des entérocytes (66). La solubilisation micellaire constitue ainsi une étape clef sans laquelle l'absorption des produits lipolytiques très hydrophobes est impossible. Outre les micelles, il existe des vésicules unilamellaires (liposomes) contenant des lipides sous forme de cristaux liquides. Ces vésicules se forment lorsque la quantité de lipides dans la lumière intestinale excède la concentration critique de sels biliaires. On retrouve donc ces deux types de structure dans la lumière de l'intestin et le cholestérol ainsi que la lyso-phosphatidylcholine y sont tous deux incorporés (116). Au moment où les produits lipolytiques entrent en contact avec le micro-environnement acide de la membrane apicale des entérocytes, les acides gras deviennent protonés ce qui réduit leur solubilité dans les micelles. Ces dernières deviennent ainsi altérées et libèrent les lipides hydrolysés pour qu'ils puissent être absorbés, les micelles demeurant dans la lumière de l'intestin (67). Lorsque le chyme atteint l'iléon, de 90 à 95% des sels biliaires sont réabsorbés et retournés au foie par le sang pour y être sécrétés de nouveau. Ce circuit est appelé cycle entérohépatique (22,115) .

1.3) Phase intracellulaire

1.3.1) Captation et réestérification des produits lipolytiques de l'entérocyte

Le passage des acides gras dans l'entérocyte est médié principalement par diffusion simple. Des études récentes effectuées par Stremmel et al. ont permis l'identification d'une protéine associée à la bordure en brosse, la FABP membranaire (Fatty Acid Binding Protein) qui lie les acides gras et jouerait ainsi un rôle dans leur absorption au niveau des microvillosités de l'entérocyte (116). Les monoacylglycérols et la lyso-phosphatidylcholine pénètrent l'entérocyte majoritairement par diffusion passive. Par contre, même si aucun transporteur spécifique n'a été identifié pour ces lipides, il semble que la FABP membranaire pourrait être impliquée dans leur absorption (29). L'entrée du cholestérol dans l'entérocyte est spécifique et faible (67). Certaines études ont proposé que la cholestérol estérase pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'absorption du cholestérol, ce qui a fait l'objet de plusieurs discussions. Une étude menée par Bosner et al. a suggéré que l'absorption du cholestérol est accomplie via la cholestérol estérase, qui, ancrée à la bordure en brosse par un lien avec l'héparine, facilite l'hydrolyse *in situ* du cholestérol ester en cholestérol libre pour favoriser son absorption (28). Cependant, une étude subséquente a démontré qu'au contraire, l'activité de la cholestérol estérase dans la bordure en brosse de l'entérocyte est modifiée par l'acidité du milieu et par conséquent, le cholestérol y est estérifié. La nature non polaire de cette forme de cholestérol favoriserait son transfert vers le feuillet cytoplasmique de la membrane de l'entérocyte pour être ensuite libéré dans le cytoplasme (29). Ces résultats ont également été confirmés par un autre groupe qui a démontré le même phénomène dans les cellules Caco-2, une lignée cellulaire dérivant d'un carcinome humain. L'addition de la cholestérol estérase purifiée dans le milieu de culture augmentait l'absorption du cholestérol ester et non celle du cholestérol libre (28). En somme, ces études suggèrent fortement que la cholestérol estérase joue un rôle important dans la régulation de l'absorption du cholestérol et il semble que le site fonctionnel de cette enzyme serait localisé dans la bordure en brosse de l'entérocyte.

Suite à leur absorption au niveau des microvillosités, les acides gras et les monoacylglycérols doivent être transportés à travers les compartiments cytosoliques aqueux de l'entérocyte et libérés dans le réticulum endoplasmique lisse pour leur élaboration en lipide complexe. Ce transport serait accompli par la FABP cytosolique. Cette protéine possède une plus grande affinité pour les acides gras insaturés à longue chaîne que les acides gras saturés et ne lie pas les acides gras à chaîne moyenne. De plus, sa concentration est plus élevée dans les villosités et le jéjunum que dans les cryptes et l'iléon. En plus de transporter les acides gras vers le réticulum endoplasmique, elle possède la capacité d'accentuer l'activité de l'Acyl-CoA synthase, enzyme qui catalyse la première étape de la réestérification des triacylglycérols (66). Dans les entérocytes de mammifères, on retrouve deux isoformes de FABP cytosolique soit la I-FABP (intestinale) et la L-FABP (hépatique). Ces deux isoformes sont principalement localisées au niveau de l'intestin grêle et représentent 1 à 2% de la masse protéique cytosolique. La I-FABP se lie plus fortement aux acides gras alors que la L-FABP se lie non seulement aux acides gras, mais aussi à la lyso-phosphatidylcholine, aux rétinoïdes, à la bilirubine et au selenium (116). Quoique que le transport du cholestérol vers le réticulum endoplasmique demeure encore incertain, il semble que la SCP (Sterol Carrier Protein) pourrait être impliquée dans son transport ce qui stimulerait également son estérification (67).

Les triacylglycérols sont les lipides les plus abondamment métabolisés par l'intestin et sont presque complètement absorbés par l'entérocyte après la lipolyse intra-luminale. Approximativement 75% des acides gras absorbés sont resynthétisés en triacylglycérol alors que le reste sert de substrat pour la réestérification des phospholipides et du cholestérol dans le cytosol ou sont directement transportés vers le foie via la veine porte en se liant à l'albumine (29). La réestérification des triacylglycérols se fait principalement par la voie du monoacylglycérol. La reconstitution des monoacylglycérols et des acides gras en triacylglycérol, durant la période postprandiale, est générée par l'action consécutive de la monoacylglycérol et de la diacylglycérol acyltransférase. Les enzymes impliquées dans cette voie sont présentes dans un complexe appelé triglycéride synthase. Elles sont localisées à la surface cytoplasmique du réticulum endoplasmique lisse, lieu de réestérification des triacylglycérols (116). En cas de

carence en monoacylglycérol, notamment durant les périodes de jeûne, l'intestin synthétise et sécrète tout de même des triacylglycérols via une seconde voie soit celle de l' α -glycérophosphate. Cette dernière contrôle les diverses étapes impliquées dans l'acylation du glycérol-3-phosphate pour former l'acide phosphatidique. En présence de la phosphohydrolase phosphatidate, l'acide phosphatidique est hydrolysé afin de former des diacylglycérols qui, associés à des acides gras, sont reconvertis en triglycéride (116).

Les phospholipides, particulièrement la phosphatidylcholine, sont des composantes essentielles des membranes cellulaires. La source majeure de phosphatidylcholine intra-luminale provient de la sécrétion biliaire (10-20 g/jour) (29). Une certaine quantité de lyso-phosphatidylcholine absorbée est réacétylée pour former la phosphatidylcholine. Le reste de la lyso-phosphatidylcholine est hydrolysée pour former du glycéro-3-phosphorylcholine. L'acide gras libéré peut être utilisé pour la formation des triglycérides et le glycéro-3-phosphorylcholine peut être transporté directement vers le sang pour son utilisation dans le foie (116). Il y a deux voies utilisées par l'intestin pour synthétiser les phospholipides soit la voie acide-phosphorylcholine phosphatidique, active surtout durant les périodes de jeûne et la voie de réacylation de la lyso-phosphatidylcholine, durant les périodes postprandiales (29).

À partir de la bordure en brosse, le cholestérol est transporté semble-t-il en partie par la SCP vers le réticulum endoplasmique où il est réestérifié. Deux enzymes semblent jouer un rôle dans la régulation de l'estérification du cholestérol intestinal soit la cholestérol estérase pancréatique et l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT). La cholestérol estérase serait internalisée par l'entérocyte et par conséquent, serait active dans le cytosol. Quant à l'ACAT, elle est présente en grande concentration au niveau du réticulum endoplasmique et son activité est augmentée par une élévation du cholestérol alimentaire (29). L'entérocyte reçoit ainsi son flux journalier de cholestérol non seulement à partir d'une source luminale soit diététique et biliaire, mais est également capable de synthétiser de novo le cholestérol. On peut également observer des récepteurs aux LDL exprimés à la membrane basolatérale des entérocytes permettant l'endocytose de cholestérol circulant (29). Une fois que la réestérification des triacylglycérols, des

phospholipides et du cholestérol a été complétée dans le réticulum endoplasmique, plusieurs processus biochimiques prennent place menant à la formation des lipoprotéines (67).

1.3.2) Composition, formation et sécrétion des lipoprotéines intestinales

Malgré la multitude d'informations que nous possédons sur l'absorption des lipides intestinaux, peu est connu à propos des mécanismes d'assemblage intracellulaire, de la modification et de la sécrétion des lipoprotéines de l'intestin grêle (116). Les lipoprotéines plasmatiques sont des complexes macromoléculaires sphériques, formés de lipides et de protéines structurales spécifiques telles que les apoprotéines. Elles permettent le transport des lipides hydrophobes à travers le milieu aqueux du cytosol cellulaire et du compartiment plasmatique pour leur éventuelle distribution dans les autres tissus (68). Le cœur hydrophobe du chylomicron, principale lipoprotéine synthétisée dans l'intestin, est constitué de lipides neutres tels que les triacylglycérols (97%) et le cholestérol ester (1-2%) alors que le cholestérol libre (1%) et les phospholipides (9%) (endogènes et biliaires préférentiellement) constituent la surface de la lipoprotéine (figure 4). La région hélicoïdale amphipatique de l'apolipoprotéine B (2%) semble requise et nécessaire à l'assemblage et l'exocytose des particules lipoprotéiniques puisqu'elle permet la liaison des lipides et l'orientation de ces apolipoprotéines sur la monocouche lipidique de surface (67). Ces protéines contribuent à la stabilisation structurale des particules de lipoprotéines, elles interagissent avec les récepteurs à la surface des cellules une fois dans la circulation interviennent comme de puissants activateurs de certaines enzymes plasmatiques impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines. La biosynthèse des apolipoprotéines est le facteur principal limitant contrôlant les taux de lipoprotéines plasmatiques et une défectuosité dans leur synthèse ou leur fonction peut affecter le métabolisme des lipoprotéines (68).

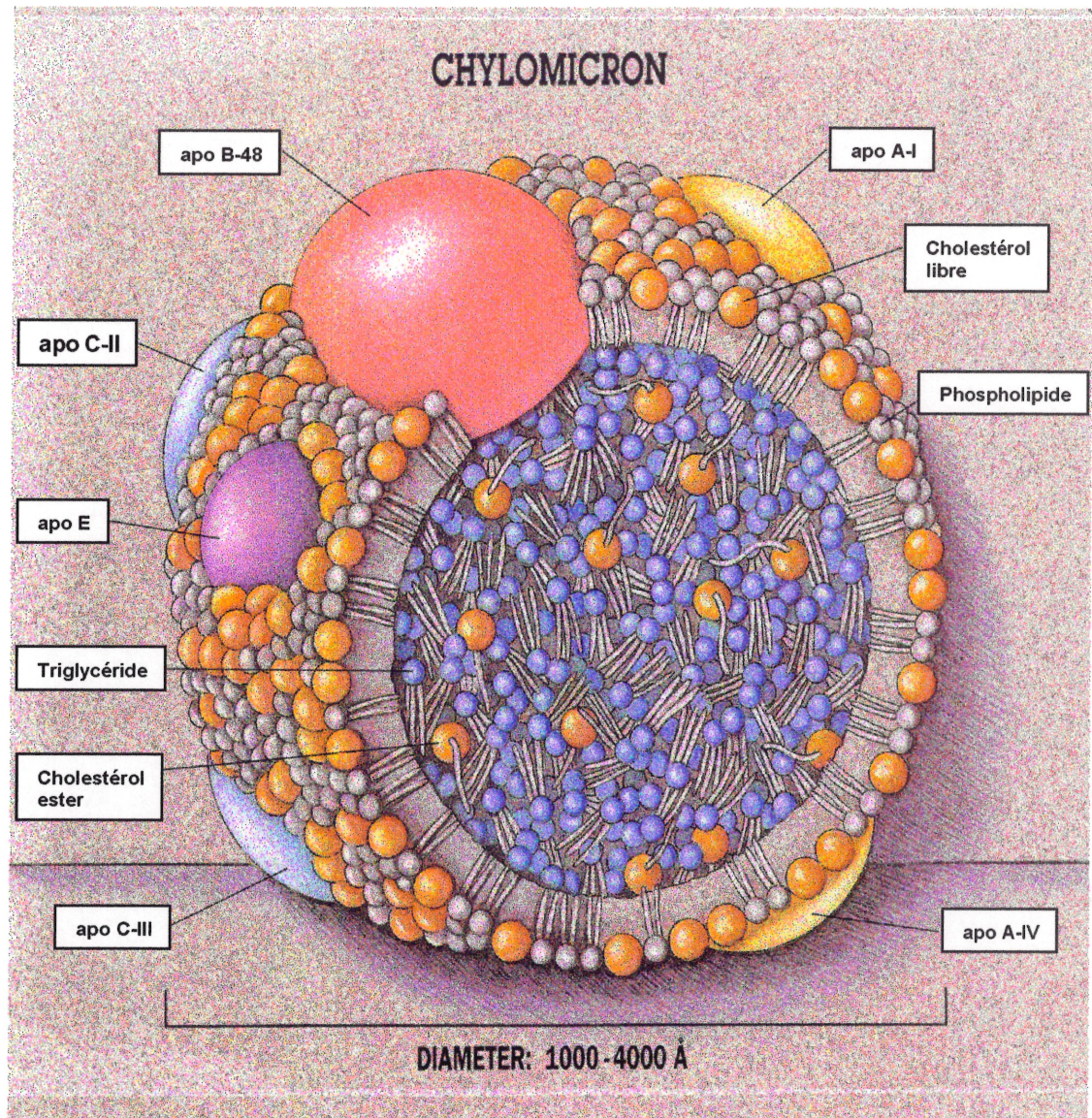


Figure 4. Structure du chylomicron
(adaptée de Grundy 1990)

Il existe au moins six gènes codant pour les apolipoprotéines dont trois d'entre eux sont principalement exprimés dans l'intestin grêle soit l'apo A-I, l'apo A-IV et l'apo B. Chez l'humain, l'apo A-I est la composante majeure des HDL et est le principal cofacteur de la LCAT (lecitine :cholesterol-acyltransferase), enzyme responsable de l'estérification du cholestérol plasmatique. La synthèse de l'apo A-I intestinal n'est pas régulée par une diète riche en lipide ce qui suggère que l'apo A-I intestinale est exprimée constitutivement. L'apo A-IV représente une autre catégorie d'apolipoprotéines exprimées abondamment dans l'intestin grêle. La distribution de l'apo A-IV diffère de l'apo A-I puisqu'elle peut circuler largement sans être liée aux lipoprotéines, quoiqu'environ 25% de l'apo A-IV plasmatique est associée aux HDL (29). De plus, elle agit comme un facteur de satiété circulant, en réponse à l'absorption de lipides (116). Sa synthèse dans les entérocytes est modulée par le flux cellulaire de triglycérides. L'intestin constitue la source primaire de synthèse et de sécrétion de l'apo A-IV et sa principale fonction semble attribuée à son action en tant que cofacteur de la LCAT. L'apo C-III est une apoprotéine faiblement exprimée dans l'intestin où son ARNm ne code que pour 0,5% des protéines totales synthétisées. La fonction de l'apo C-III semble orientée vers la régulation de la captation hépatique des particules résidues. Elle est régulée à la hausse par la présence de triglycérides intestinaux. Les apo A-II, C-I et C-II sont également des apolipoprotéines peu traduites dans l'intestin et leur régulation n'a pas vraiment été établie (29). Il semble que l'apo C-II serait très importante puisqu'elle est essentielle à l'activation de la lipoprotéine lipase qui est responsable du catabolisme des chylomicrons à la suite de leur exocytose de l'entérocyte (66). Les apo C et E sont majoritairement transférées aux chylomicrons dans la circulation après l'interaction avec les HDL. Finalement, l'apo B est synthétisée dans les entérocytes et les hépatocytes de mammifères en tant que composante obligatoire des lipoprotéines riches en triglycéride en l'occurrence les chylomicrons et les VLDL (Very Low Density Lipoprotein). On retrouve deux formes majeures d'apo B soit l'apo B-48, synthétisée uniquement dans l'intestin et l'apo B-100, produites par le foie. L'apo B est le produit d'un seul gène qui est situé sur le chromosome 2. Dans l'intestin grêle, l'apo B est transcrit en un ARNm dans lequel il y a un site spécifique de déamination du résidu cystéine produisant un codon UAA ou codon stop prématuré. Cette altération posttranscriptionnelle de l'apo B traduit une protéine tronquée qui correspond à 48% de l'apo B-100. La conséquence fonctionnelle de

cette modification est que le chylomicron (apo B-48) est éliminé de la circulation dans un délai de 30 minutes alors que les particules contenant l'apo B-100 comme les LDL (Low Density Lipoprotein), le sont avec une demi-vie plus grande que deux jours, ce qui démontre un mécanisme évolué pour la livraison des triacylglycérols vers le foie (29).

L'intestin peut synthétiser trois types de lipoprotéines soit les chylomicrons (CM), les VLDL et les HDL (High Density Lipoprotein) (67) (tableau II). Les CM sont les principales lipoprotéines synthétisées par l'intestin grêle et constituent les principaux transporteurs de triglycérides diététiques. Ils ont une taille approximative de 80 à 500 nm et sont principalement assemblés durant les périodes d'absorption de lipides, soit postprandiale. Quant aux VLDL intestinales, elles sont surtout synthétisées durant les périodes de jeûne (68). Elles sont plus petites que les CM (25–80 nm) et elles ont une composition différente en lipides, mais leur composition en apoprotéines ne diffère pas (116). Leur ressemblance avec les CM suggère qu'elles sont de la même origine, mais leur volume dépend de la disponibilité des triacylglycérols intracellulaires. L'assemblage des CM et des VLDL par contre, semble prendre des voies différentes. Ockner et al. ont été les premiers à supporter cette évidence. Ils ont démontré qu'une infusion intra-duodénale d'oléate et de linoléate occasionnait aucun changement marqué dans le transport des VLDL alors que celui des CM était considérablement augmenté suite à l'infusion de ces deux acides gras. D'autre part, les études ultrastructurales et biochimiques menées par Mahley et collaborateurs ont démontré que les vésicules de Golgi intestinales contenaient des VLDL et des CM dans des vésicules distinctes, suggérant ainsi l'existence de deux voies d'assemblage différentes pour les VLDL et les CM. Les travaux de Tso et al. ont également appuyé ce postulat par l'utilisation de Pluronic L-81, connu pour altérer le transport lymphatique des triacylglycérols et du cholestérol. Ils ont observé que l'incorporation de cette substance dans la diète des rats freinait le transport des lipides en inhibant la formation des CM et non celle des VLDL. L'ensemble de ces résultats a donc permis de confirmer l'hypothèse stipulant la présence de deux voies d'assemblage des lipoprotéines intestinales (116). L'intestin sécrète également des HDL natives. Elles sont de forme discoïdale, d'un diamètre de 6 à 13 nm et sont enrichies en phospholipides ainsi qu'en cholestérol ester et l'apo A-I est majoritaire.

C'est au niveau du réticulum endoplasmique que sont synthétisées les lipoprotéines intestinales. Les lipides réestérifiés dans le réticulum endoplasmique lisse (REL) sont transférés vers le réticulum endoplasmique rugueux (RER), où est synthétisée l'apo B-48, laquelle s'associe au cœur lipidique pour former les CM natifs. Les études menées par Wetterau et Zilversmit ont démontré la présence d'un complexe protéique dans le foie et l'intestin qui serait responsable du transfert des triglycérides et du cholestérol ester à travers les membranes. Comme ces deux organes ont une grande activité de transfert et sont tous deux responsables de la synthèse de lipoprotéines, il a été spéculé que cette protéine de transfert serait impliquée dans le transfert des lipides réestérifiés du REL vers le RER, qui est le lieu de synthèse des lipoprotéines intestinales (116). Des études subséquentes dirigées par Wetterau ont permis d'identifier cette protéine de transfert comme étant le « microsomal triglyceride transfer protein » (MTP). Elle a été isolée pour la

Tableau II. Classification et propriétés des lipoprotéines plasmatiques

Lipoprotéines	Composante (s) lipidique (s) majeure (s)	Apolipoprotéine(s)	Densité (g/mL)	Diamètre (Å)	Sources
chylomicron	TG	A-I, A-II, A-IV, C, B-48, E	<0.95	800-5000	intestin
résidus de chylomicron	CE, TG	B-48, E	<1.006	>500	plasma
VLDL	TG	B-100, C, E	<1.006	300-800	foie
IDL	CE	B-100, C, E	1.006-1.019	250-350	catabolisme des VLDL _s
LDL	CE	B-100	1.019-1.063	180-280	catabolisme des IDL _s
HDL					
HDL ₂	CE, PL	A-I, A-II	1.063-1.125	90-120	foie, intestin, autres
HDL ₃	PL	A-I, A-II	1.125-1.210	50-90	foie, intestin, autres

(adaptée de Gotto et Pownall 1999)

première fois dans la lumière des microsomes extraits du foie de bovins et par la suite du foie et de l'intestin de rats. La majorité de l'activité de transfert est retrouvée dans la fraction microsomiale et la protéine semble y demeurer, d'où son appellation (70). Les CM natifs sont ensuite transportés vers le Golgi où prend place la glycosylation ainsi qu'une série de modifications dans leur composition en lipides leur permettant ainsi d'atteindre leur forme mature et par le fait même, de terminer leur assemblage (116). Les microtubules jouent un rôle important dans le transport intracellulaire et dans la sécrétion des CM. Les protéines contractiles agissent de façon à diriger les vésicules de Golgi contenant les CM à des sites de reconnaissance spécifique de la membrane latérale (66). Ainsi, les vésicules de Golgi contenant les CM matures migrent vers la membrane latérale de l'entérocyte et subséquemment au processus de fusion des vésicules de Golgi à la membrane, les lipoprotéines riches en triglycéride sont relâchées dans l'espace intercellulaire (116) (figure 5).

1.4) Métabolisme des lipoprotéines intestinales

Les CM prennent la circulation lymphatique en traversant les fenestrations de l'endothélium des capillaires et subissent immédiatement une série de modifications de leur composition en protéine de surface. Les CM intracellulaires natives contiennent principalement de l'apo A-I, de l'apo A-IV et de l'apo B-48 comme composante protéique de surface. Suite à leur entrée dans le compartiment lymphatique, les CM acquièrent par un échange passif, les apo E, C-II et C-III provenant des HDL plasmatiques, un processus durant lequel les apo A-I et A-IV ainsi que les phospholipides sont à leur tour transférés aux HDL. Les CM sont ensuite transportés vers le lit de capillaires des tissus périphériques où le cœur de triacylglycérols subit une hydrolyse médiée par la lipoprotéine lipase. L'apo C-II est un cofacteur critique dans l'activation de cette enzyme et une déficience en cette apoprotéine est associée à une hypertriglycémie sévère et à une accumulation de CM. Les acides gras libérés, suite au catabolisme du cœur de triglycérides, diffusent dans le foie et les cellules adipeuses et s'associent à nouveau avec le glycérol produit par les cellules pour reformer des triglycérides. Le CM résultant de cette hydrolyse subit des modifications substantielles résultant en la perte de la

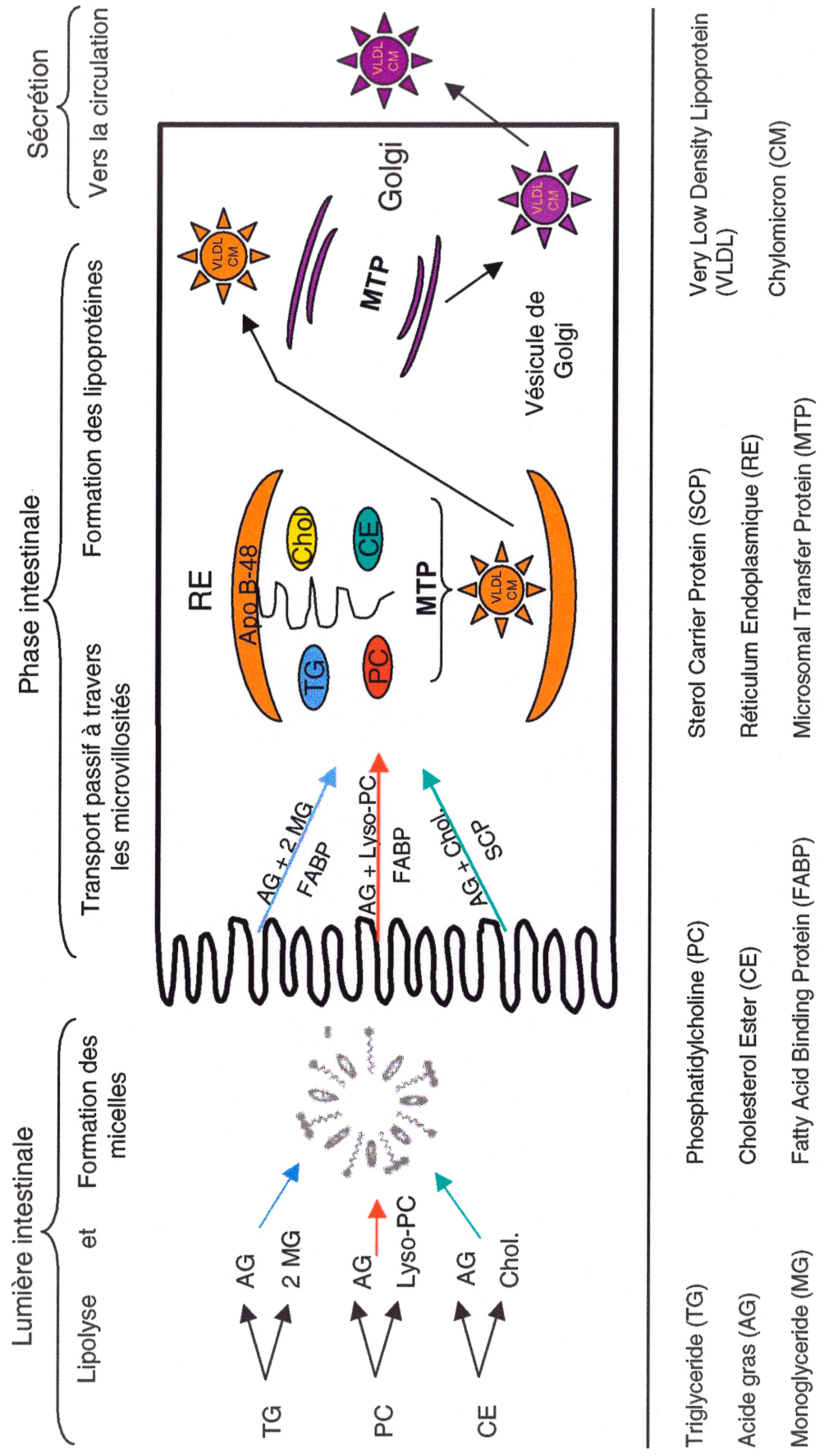


Figure 5. Voie de synthèse et d'excrétion des lipoprotéines intestinales. Suite à la digestion des lipides complexes, les produits lipolytiques traversent les microvillosités et sont transportés vers le RE via des transporteurs intracellulaires spécifiques (FABP, SCP). Les produits de la lipolyse y sont resynthétisés pour être ensuite transférés, par le MTP, autour de l'apo B ce qui facilite sa translocation dans la portion luminale du RE. C'est à cet endroit que la formation des CM est initiée. La lipodation de la lipoprotéine se continue et se termine au niveau du Golgi où, semble-t-il, s'ajouterait, via le MTP, des gouttelettes de TG préformées afin de compléter la biogenèse des CM. Ces derniers sont finalement sécrétés hors de l'entérocyte, vers la circulation sanguine.

majorité des apolipoprotéines de surface, à l'exception de l'apo E et de l'apo B-48. Cette particule est identifiée en tant que résidu de CM et est transportée vers plusieurs sites incluant le foie où il semble se lier à un récepteur de surface cellulaire. L'apo E en serait le ligand. La prise hépatique des résidus de lipoprotéines riches en triglycéride est également modulée par la présence d'apo C à la surface de la lipoprotéine (29).

La diversité des désordres métaboliques associés à la synthèse des lipoprotéines intestinales est à la mesure de la complexité des mécanismes impliqués dans l'assemblage des lipoprotéines. Une défectuosité dans l'une ou l'autre des diverses étapes constituant le processus d'assemblage des lipoprotéines peut altérer leur formation et leur sécrétion hors de l'entérocyte. Entre autre, le MTP est essentiel à la synthèse des CM puisqu'il permet la lipidation de l'apo B en transférant les lipides nouvellement synthétisés autour de cette apolipoprotéine, de façon à former un cœur lipidique, sans quoi elle serait dégradée. Cette étape confère au MTP toute son importance dans l'assemblage des lipoprotéines intestinales puisqu'on a récemment découvert que l'altération de cette protéine causait l'abetalipoprotéïnémie, un désordre lipoprotéïnémique important.

2. MTP : une protéine clef pour l'assemblage et l'exocytose des lipoprotéines intestinales

2.1) Désordre métabolique associé à une déficience génétique du MTP

L'abetalipoprotéïnémie (ABL) est une maladie autosomale récessive rare, caractérisée par une absence d'apolipoprotéines B (apo B) plasmatiques ainsi que par des concentrations faibles de triglycérides et de cholestérol dans le plasma. Ces modifications sont le résultat d'une déficience génétique au niveau du MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein), une protéine essentielle à l'assemblage et à la sécrétion des VLDL et des CM dans le foie et l'intestin, respectivement. Conséquemment, les sujets atteints sont porteurs de malabsorption des lipides causant une stéatose, observable par l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les entérocytes et les hépatocytes. Ces patients souffrent également de carences en vitamine A, E, et K puisque ces vitamines liposolubles requièrent la présence de véhicules lipidiques tels que les lipoprotéines riches en triglycérides afin de pouvoir être transportées dans les différents tissus de l'organisme (130). Les patients abetalipoprotéïnémiques peuvent développer diverses pathologies d'ordre gastro-intestinales, neurologiques, ophtalmologiques et hématologiques. Bassen et Kornzweig ont été les premiers à décrire ces manifestations cliniques suggérant précocement que les anomalies associées à cette maladie sont attribuables à un défaut de transport des graisses (14).

Cette hypothèse a été confirmée par des études ultrastructurales de biopsies d'intestin et de foie de patients abetalipoprotéïnémiques où il était possible d'observer une accumulation de gouttelettes lipidiques et une absence de formation de particules lipoprotéïnémiques (14). On croyait initialement que ces anomalies associées à l'assemblage des lipoprotéines étaient reliées à l'absence de synthèse de l'apo B. Cependant, des études subséquentes utilisant des approches immunohistochimiques, moléculaires et génétiques ont démontré que le gène de l'apo B n'était pas directement impliqué dans l'étiologie de l'abetalipoprotéïnémie (14). Par contre, plusieurs pistes indiquaient plutôt l'implication du MTP dans les anomalies caractérisant cette maladie.

Le MTP est une protéine soluble, principalement localisée dans la lumière des microsomes isolés de foie et d'intestin. Elle est composée d'une large sous-unité de transfert de 97 kDa associée à un second peptide de 58 kDa, la Protéine Disulfide Isomerase (PDI). Cette dernière est localisée dans le réticulum endoplasmique de la plupart des tissus. Elle ne s'associe donc pas de façon restrictive à la large sous-unité du MTP, mais semble nécessaire au maintien de l'intégrité structurale de cette protéine de transfert. De plus, elle permet la formation de liens disulfides ce qui contribuerait au repliement adéquat des protéines nouvellement synthétisées (128,14). Quoique cet hétérodimère puisse catalyser le transfert de toutes les classes de lipides (triglycéride, phospholipide, cholestérol libre et estérifié) à travers les membranes, les études *in vitro* nous permettent de constater qu'il transfère préférentiellement les triglycérides et le cholestérol ester (38). Le PDI ne possède pas d'activité de transfert des lipides. Il semble donc que la large sous-unité de 97 kDa serait la composante active qui conférerait l'activité de transfert au complexe protéique (128).

La distribution tissulaire, la localisation subcellulaire et les propriétés de transport lipidique du MTP ont permis d'émettre l'hypothèse que cette protéine pouvait être responsable de l'abeta lipoprotéinémie, considérant son rôle primordial dans l'assemblage des lipoprotéines riches en apo B. Puisque le MTP transporte les lipides de leur site de synthèse dans la membrane du RE vers le site de biogenèse des particules lipoprotéinémiques, localisé dans la lumière du RE, une déficience au niveau de la fonction de cette protéine pourrait contribuer à la manifestation de cette maladie (129). Wetterau et al. ont été les premiers à établir un lien entre le MTP et l'ABL. Ils ont observé que dans les biopsies de patients atteints de cette maladie, la sous-unité de 97 kDa du MTP était absente, mais le PDI était détecté. Parallèlement à ces observations, l'activité de transfert du MTP, mesurée *in vitro* avec ces mêmes biopsies, s'est avérée inexistante. L'ensemble des résultats suggère donc que le gène codant pour la large sous-unité du MTP est impliqué dans l'ABL (128). Ces observations ont été confirmées par plusieurs études qui ont rapporté des mutations au niveau du gène de la large sous-unité du MTP chez les sujets atteints de cette maladie (101,106,97,83,96,86). Plus de 18 mutations différentes ont été identifiées jusqu'à aujourd'hui et la plupart d'entre elles mènent à l'expression d'une forme tronquée de la large sous-unité du MTP (14). Ainsi, les efforts consacrés à l'étude

des causes de l'ABL ont permis d'établir la preuve que le MTP est probablement requis dans le processus d'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides, excluant l'apo B comme facteur étiologique de l'ABL.

2.2) Assemblage des lipoprotéines intestinales

L'assemblage des chylomicrons (CM) constitue un processus complexe s'accomplissant en plusieurs étapes dans lesquelles une interaction étroite entre l'apo B, diverses classes de lipides et le MTP peut être observée. Simultanément à sa synthèse, l'apo B (transmembranaire) débute sa translocation à travers la membrane du RE. Les lipides sont transférés à la portion N-terminale de l'apo B par le MTP, de façon co-translationnelle. Cette lipidation entraîne l'apo B vers la lumière du réticulum endoplasmique ce qui permet la formation d'une particule de lipoprotéine native, complétant ainsi la première étape d'assemblage de la lipoprotéine. Un deuxième lot de lipides est ensuite ajouté à l'apo B afin de compléter la synthèse de la lipoprotéine. La formation de ce cœur lipidique empêche la dégradation de l'apo B et facilite son incorporation dans la particule de lipoprotéine. Ainsi, la biogenèse des CM ne repose pas que sur l'action du MTP, mais dépend de l'effet combiné de l'activité de transfert du MTP, de la disponibilité des lipides et de la taille adéquate du polypeptide d'apo B à la réception d'une charge lipidique (14).

2.2.1) Synthèse et sécrétion de l'apolipoprotéine B

Suite à la traduction et l'initiation de la translocation de l'apo B dans la lumière du RE, la portion N-terminale de l'apo B commence à se replier en une structure d' α -hélices globulaires compactes, retenues par 7 liens disulfides. Le repliement adéquat de ce domaine est essentiel afin que les étapes subséquentes de repliement des feuillets β , domaines liant les lipides, puissent se faire correctement. La nature amphipatique de l'apo B ne lui permet pas d'être stable dans un environnement aqueux. Elle requière ainsi la présence des lipides sans lesquels, l'apo B demeurera dépliée, agrégée, associée à la membrane du RE ou encore immature dans sa translocation vers la lumière du RE afin d'être incorporée dans une particule lipoprotéinémique. Dans toutes ces conditions, l'apo B est dégradée plutôt que sécrétée (38). Ingram et Shelness (53) ont démontré que

l'initiation de la formation des lipoprotéines dans le réticulum endoplasmique prend place en deux étapes : la première consiste en un repliement co-translationnel du domaine N-terminal de l'apo B suivie, en second lieu, de l'association des lipides à la chaîne peptidique de l'apo B qui dépend de l'action du MTP (53); la deuxième étape, cruciale au devenir de l'apo B, est initiée lorsque la protéine native atteint une taille d'environ 80 kDa (16). Quoique Bennett et al. (11) ont bien mis en évidence le contrôle transcriptionnel du gène et de la synthèse de l'apo B, il demeure que la sécrétion de l'apo B est régulée en grande partie par un mécanisme posttranscriptionnel. Les activités protéolytiques dirigées contre l'apo B s'avèrent être des moyens efficaces pour moduler la sécrétion de cette apolipoprotéine (132).

Afin de saisir les mécanismes impliqués dans le processus d'assemblage des lipoprotéines, la compréhension de la voie dégradative de l'apo B est d'abord requise. Cartwright et Higgins ont démontré que la dégradation de l'apo B prenait place dans le RE et dans le trans-Golgi où plusieurs protéases y sont impliquées (21). Ce système de dégradation protéique co-translationnel et ATP-dépendant, est connu sous l'appellation du protéasome. Cette voie de dégradation permet l'élimination des protéines repliées incorrectement ou inutilisées (69). Le protéasome est composé de diverses enzymes protéolytiques et d'une protéine chaperone cytosolique, la Hsp 70 (heat shock protein 70). L'apo B devient susceptible à cette activité enzymatique protéolytique si elle est incorrectement repliée ou encore s'accumule au niveau de la membrane du RE, suite à une lipidation co-translationnelle inadéquate qui est essentiellement causée par une synthèse lipidique ou une activité du MTP réduite (135). Lors de sa synthèse, l'apo B demeure majoritairement liée à la membrane du RE plutôt que d'être complètement transloquée du côté luminal tel que la plupart des protéines sécrétrices. Cette translocation partielle permet au domaine N-terminal (70 kDa) de s'insérer dans la portion luminale de la membrane du RE alors que la majeure partie du polypeptide est exposée du côté cytosolique. Lorsque la disponibilité des lipides est limitée, l'apo B (cytosolique) tend à former des agrégats qui s'avèrent ainsi accessibles aux diverses composantes de la voie du protéasome (103). Certaines études ont établi que l'apo B native anormalement repliée interagit avec la Hsp 70 (135,137). De plus, il semble que la proportion d'apo B nouvellement synthétisée et liant cette protéine chaperone, augmente substantiellement en absence de lipides

et diminue en leur présence. Sachant que la Hsp 70 lie fortement les protéines repliées incorrectement, on peut donc supposer que l'association entre l'apo B et les lipides est primordiale pour assurer l'initiation d'un repliement adéquat.

Fisher et al. ont procuré l'évidence que la Hsp 70 peut jouer un rôle dans le ciblage et la disposition de l'apo B défective en influençant sa dégradation par l'intermédiaire de la voie du protéasome (34). Une étude plus récente menée par Zhou et al. a corroboré l'existence d'un lien direct entre la protéine Hsp 70 et l'apo B (138). Le ciblage de l'apo B par cette protéine chaperone constitue un mécanisme de régulation métabolique qui joue un rôle de protection contre l'accumulation d'agrégats de cette apoprotéine qui pourrait devenir potentiellement toxique dans le RE (34). La Hsp 70 lie ainsi la portion cytosolique de l'apo B, en maintenant une conformation agrégée qui constitue un meilleur substrat pour les enzymes associées à l'ubiquitination et pour le protéasome (34). Par contre, le moment précis durant le processus de traduction-translocation où l'apo B est exposée au cytosol demeure encore incertain. Deux modèles de dégradation protéosomale de l'apo B ont été proposés: soit 1) via une dégradation protéolytique co-traductionnelle où l'apo B serait directement exposée aux diverses composantes de la voie dégradative qui, tel un ciseau, couperaient la portion du polypeptide exposée au cytosol et laisserait le domaine amino-terminal (70 kDa) déjà transloqué, dans la lumière du RE (138,69) ou 2) via une dégradation protéolytique post-traductionnelle par laquelle l'apo B complètement transloquée serait retiré, du RE vers le cytosol, par un transport rétrograde (34,138,69) (figure 6). Des études récentes ont cependant procuré plusieurs évidences soutenant le premier modèle de ciblage de l'apo B au protéasome (89,69,138). L'ensemble de ces observations indique que l'apo B nécessite une interaction avec les lipides afin de conserver une conformation adéquate ce qui empêche la protéine Hsp 70 de s'y lier pour la conduire au protéasome.

La régulation de l'assemblage et de la sécrétion de l'apo B dépend non seulement de la disponibilité des lipides, mais de façon plus importante, de l'activité du MTP. On peut supposer, à partir des données existantes, que l'inhibition de

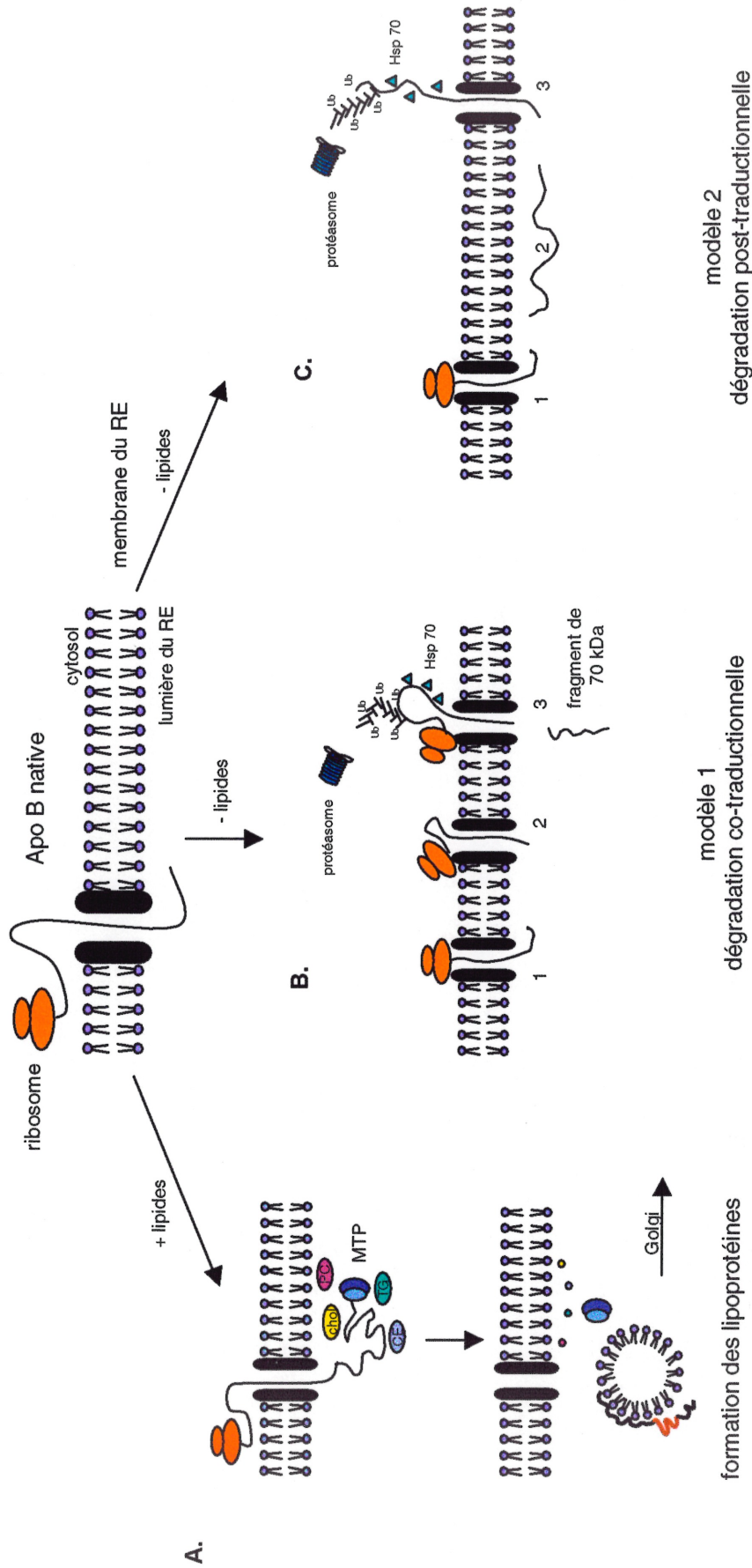


Figure 6. Modèles de biogenèse et de dégradation intracellulaire de l'apo B. La translocation de l'apo B à travers la membrane du RE requiert la présence de lipides et en la formation co-traductionnelle de l'apo B. Lorsque la synthèse et le transfert des lipides sont adéquats, l'apo B commence à être enveloppé de lipides résultant en l'assemblage et en la formation co-traductionnelle des lipoprotéines (A). Une disponibilité réduite des lipides occasionne l'arrêt de la translocation de l'apo B, qui se retrouve ainsi orientée de façon transmembranaire. Cette position expose certains domaines de l'apo B au cytosol la rendant ainsi accessible à l'ubiquitination et à la protéolyse via le protéasome. Si l'apo B emprunte la voie dégradative durant sa traduction, la translocation du polypeptide n'est pas complétée. La portion cytosolique de l'apo B se lie alors à la Hsp 70 et est dégradée via le protéasome, tout en relarguant la portion N-terminale (70 kDa) dans la lumière du RE (B). Par contre, l'exposition de l'apo B aux différents facteurs dans la voie dégradative, après sa traduction, peut provoquer un transport rétrograde afin de pouvoir se lier à la Hsp 70 cytosolique et d'être dégradée par les enzymes protéolytiques présents dans le protéasome (C).

l'activité du MTP produirait le même effet qu'une absence de lipides sur la dégradation co-traductionnelle de l'apo B. Il est alors possible de formuler l'hypothèse que le MTP médie la lipidation de l'apo B lui permettant de se replier correctement pour son incorporation dans une particule lipoprotéinique plutôt que de se lier à la Hsp 70 pour subir sa dégradation. Zhou et al. ainsi que Benoist et Grand-Perret (138,13) ont justement démontré que le traitement de cellules avec un inhibiteur du MTP stimulait l'ubiquitination de l'apo B de la même façon qu'un manque de lipides l'aurait fait. L'implication du MTP a également été constatée par Wang et al. qui ont utilisé des cellules COS-7, transfectées avec le gène codant pour une forme tronquée de l'apo B, avec ou sans la co-expression du MTP, pour démontrer que la présence du MTP réduit la dégradation co-traductionnelle de l'apo B, permettant ainsi l'assemblage et la sécrétion des VLDL (120). Ces résultats supportent solidement l'hypothèse que le MTP permet le transfert des lipides à l'apo B ce qui est primordial à l'initiation de l'assemblage des lipoprotéines.

La disponibilité des lipides intracellulaires et leur ajout à l'apo B au moment approprié constitue également un facteur de régulation posttranscriptionnel de la sécrétion de l'apo B et semble critique à la stimulation du MTP pour la sécrétion des lipoprotéines. L'addition des lipides à l'apo B se produit en deux étapes distinctes, impliquant la production co-traductionnelle d'une lipoprotéine native pauvre en lipides, suivie par l'addition massive de lipides à la lipoprotéine de base (132). Le MTP pourrait être impliqué dans l'une ou l'autre des ces 2 étapes. Plusieurs évidences confirment le rôle prépondérant du MTP dans la première séquence, mais son implication à l'étape ultérieure demeure encore incertaine (37). Wu et al. ont d'ailleurs démontré une association prédominante entre le MTP et l'apo B dans les stades précoces d'assemblage des lipoprotéines (133). Cependant, des études additionnelles s'avéraient nécessaires afin de préciser la fonction et l'implication du MTP dans le métabolisme des lipoprotéines.

2.2.2) Rôle du MTP dans l'assemblage des lipoprotéines intestinales

Le rôle spécifique du MTP, mais surtout son importance dans l'assemblage des lipoprotéines riches en apo B, ainsi que les facteurs régulant ce processus tels

que la disponibilité des lipides et la taille du polypeptide d'apo B, ont été clarifiés par de nombreuses études. Celles-ci ont tenté d'examiner une étape particulière du processus d'assemblage des lipoprotéines en utilisant différents types cellulaires hépatiques et hétérologues, transfectés avec le MTP et des formes tronquées d'apo B (65,36,51,40,90,121,57). L'analyse de la fonction du MTP, dans ces divers modèles, n'a cependant pas permis de déterminer l'implication du MTP dans les stades de lipodation précoce et tardif de l'apo B.

2.2.2.1) Implication du MTP dans la 1^{ère} étape de lipodation de l'apolipoprotéine B

Une des hypothèses concernant le rôle du MTP dans le processus d'assemblage des lipoprotéines riches en apo B est que le MTP n'est pas responsable de l'ajout de la masse lipidique retrouvée dans la particule lipoprotéïnémique mature, mais serait responsable seulement des étapes précoces initiant le processus de formation des lipoprotéines. Plusieurs évidences sont maintenant disponibles pour supporter cette hypothèse. De petites particules d'apo B, d'une densité équivalente à celle des HDL ou à celle de petites LDL, peuvent être sécrétées par des lignées cellulaires hépatiques et intestinales. Effectivement, lorsque le fragment N-terminal de l'apo B, supérieur à 25% de l'apo B-100, est exprimé dans les cellules dérivant de foie, des particules lipoprotéïnémiques sont sécrétées (134,109). Or, chez les patients abetalipoprotéïnémiques, on ne retrouve même pas de telles particules. À partir de ces observations, il serait donc possible de suggérer que la formation des particules lipoprotéïnémiques apparaissant en l'absence du MTP se manifeste à une étape précoce du processus d'assemblage, avant la sécrétion de ces petites particules. Du et al. ont constaté un niveau élevé de la portion N-terminale du peptide d'apo B-100 présent dans le plasma des sujets abetalipoprotéïnémiques. Ces observations leur ont permis de proposer que le blocage de l'assemblage des lipoprotéines chez les ABL est causé par un arrêt de la translocation de l'apo B dans le RE (32). Des résultats similaires ont été obtenus au niveau d'expérimentations effectuées à partir de cellules exprimant l'apo B, mais exemptes de MTP, où la translocation de l'apo B était arrêtée et l'apo B subissait un clivage protéolytique qui produisait un fragment N-terminal de l'apo B, le même que celui observé chez les patients atteints d'ABL (31).

Gretch et al. ont également démontré, en co-exprimant des fragments d'apo B et le MTP dans des cellules d'insectes, que la portion N-terminale de l'apo B est requise pour le MTP et permet la sécrétion de l'apo B. D'ailleurs, seules les constructions d'apo B contenant la portion N-terminale sont sécrétées (40). Ces résultats corroborent le modèle d'assemblage des lipoprotéines dans lequel tiennent place la portion amino-terminale de l'apo B et le MTP qui joue un rôle primordial dans ce processus précoce.

Des études utilisant un inhibiteur du MTP ont également permis de confirmer le rôle du MTP dans les étapes primaires du processus d'assemblage, suggérant également l'absence de son implication dans les étapes ultérieures (37). En absence de lipides, des particules natives riches en apo B, de densité équivalente à celle des HDL, sont formées, mais non sécrétées (16). L'ajout de lipides permet leur conversion en particules matures pouvant être sécrétées. Or, si le MTP est neutralisé par un inhibiteur spécifique après la formation du complexe lipoprotéinique pauvre en lipides, mais avant la conversion en particules riches en lipides, il n'y a pas d'effets sur cette conversion ou sur le processus de sécrétion de ces particules riches en lipides. Ces données suggèrent que l'inhibition du MTP n'interrompt l'assemblage des lipoprotéines qu'à une étape précoce du processus et que le MTP ne participe pas aux étapes ultérieures de l'assemblage des lipoprotéines riches en apo B-48 (37).

En somme, une portion de l'apo B-100 s'associe co-traductionnellement avec les lipides dans un processus qui mène à la formation d'une lipoprotéine mature qui est sécrétée (15). Récemment, il a été constaté que l'apo B-48 forme initialement une petite particule dense qui sert d'intermédiaire dans la formation de lipoprotéines matures (16,111). Cette observation supporte également l'hypothèse que l'assemblage des lipoprotéines riches en apo B se fait en deux étapes distinctes où des lipides, tels que les triacylglycérols, la phosphatidylcholine et le cholestérol ester, sont ajoutés à une particule native pour former une lipoprotéine mature (109). Ainsi, la sécrétion de l'apo B est régulée co et post-transcriptionnellement par la disponibilité des lipides (130).

2.2.2.2) Implication du MTP dans la 2^{ème} étape de lipidation de l'apolipoprotéine B

Le rôle du MTP dans le second stade d'assemblage des lipoprotéines demeure encore controversé. Il existe deux mécanismes possibles par lesquels le cœur lipidique pourrait être ajouté à la particule lipoprotéïnémique native produite durant le premier stade d'assemblage : 1) par addition continue de molécules individuelles de lipides permettant ainsi l'augmentation graduelle de la taille de la lipoprotéine, ce transfert possiblement médié par le MTP; et 2) par la fusion de la particule de lipoprotéine précurseur avec une gouttelette lipidique préformée, causant une augmentation instantanée de la taille de la particule native en une lipoprotéine mature (14). Le premier mécanisme semble cependant peu probable puisque certaines études ont démontré que le MTP utilisait un système de transfert pour le transport des lipides et il semble que l'addition de molécules lipidiques une à la fois à l'apo B constituerait un processus peu efficace (130). Les évidences supportant le deuxième mécanisme proviennent d'études effectuées par Alexander et al., où ils ont pu observer, par des analyses ultrastructurales, une confluence de petites particules riches en apo B provenant du réticulum endoplasmique rugueux (RER) ainsi que de larges gouttelettes contenant des triglycérides dérivant du réticulum endoplasmique lisse (REL), à la jonction de ces deux organelles (2). Ces observations les ont menés à poser l'hypothèse que la lipidation de la particule de lipoprotéine native par un cœur lipidique se produisait via une fusion entre les deux à la jonction du REL et du RER (2).

Les inhibiteurs du MTP ont été utilisés pour vérifier l'implication du MTP dans les étapes ultérieures du processus d'assemblage. Gordon et al. ont utilisé la lignée cellulaire McA-RH7777 pour étudier l'effet d'un inhibiteur du MTP sur son rôle dans l'addition des lipides neutres aux particules lipoprotéïnémiques natives, riches en apo B. Quoique l'activité du MTP ait été diminuée de plus de 75%, les cellules ont conservé la capacité de sécréter des VLDL riches en apo B-48 suite à l'addition d'acide oléique. Ces résultats suggèrent que le MTP n'est pas directement impliqué dans le second stade d'addition de la masse lipidique aux particules d'apo B natives, signifiant que cette étape est indépendante de l'action du MTP (37). Une récente étude similaire, effectuée par Wang et al., a rapporté des résultats contradictoires. Ils ont démontré qu'à l'inverse, suite à l'ajout de l'inhibiteur du MTP,

ils pouvaient observer une inhibition de la production de VLDL riches en apo B-48 de 80%, après une stimulation avec l'oléate pour activer la seconde étape de lipidation. Ces résultats indiquent que la deuxième étape de lipidation serait dépendante du MTP (121). Des résultats confirmant ces données ont été observés suite à la mesure de la sécrétion des triglycérides cellulaires (122). Ils ont spéculé que le MTP faciliterait le mouvement des triglycérides dans le RE où ils deviendraient disponibles pour la lipidation de la particule contenant l'apo B-48. Ils ont également proposé que le MTP faciliterait ce processus en favorisant la formation de gouttelettes lipidiques comme les avaient observées Alexander et al. dans les études ultrastructurales (2). Ce concept fut également supporté par les études récentes de Raabe et al. où, suite au blocage du gène du MTP chez la souris (knockout), la présence de particules de taille équivalente à celle des VLDL dans le RE était indétectable (94). Ils conclurent que l'absence du MTP empêche l'entrée de lipides dans le RE, suggérant que le MTP semble jouer un rôle dans le transfert des triglycérides au niveau de la lumière du RE, peut-être en promouvant la formation de gouttelettes lipidiques dans le REL, lesquelles pourraient ensuite fusionner avec les particules natives d'apo B-48.

Des études *in vitro* ont démontré que le MTP utilise un système de transfert pour le transport des lipides. Suite à leur synthèse dans le feuillet externe de la membrane du RE, les triglycérides devraient être capables de s'équilibrer rapidement entre les deux feuillets membranaires du RE. Une fois dans le feuillet interne de la membrane du RE, les triglycérides peuvent être transportés vers une particule d'apo B dans la lumière du RE. Le MTP permettrait le transfert de ces lipides puisque cette protéine possède la propriété d'interagir avec les surfaces membranaires. Ce mode d'action a été démontré par une étude illustrant le transport des triglycérides d'une vésicule unilamellaire distributrice vers une vésicule unilamellaire acceptrice, et ce processus est directement proportionnel à la concentration de triglycérides dans ces vésicules. Il existe une relation évidente entre la concentration de triglycérides de la membrane donneuse et l'habileté du MTP à acquérir les triglycérides de cette membrane (5). Considérant les résultats de ces études, il est possible de proposer que le MTP favoriserait la préparation des deux structures ayant préséance dans la formation des particules de VLDL riches en apo B-48, à savoir la synthèse de particules d'apo B-48 natives de densité

comparable à celle des HDL et la formation de gouttelettes lipidiques riches en triglycérides. Cependant, le MTP ne semble pas impliqué dans la conversion même de la particule native en particule lipoprotéïnémique mature (38). Ce déroulement s'établirait selon un mécanisme encore inconnu, pouvant possiblement impliquer un processus de fusion préalablement décrit par Alexander et al. (2).

Il est important de mentionner qu'étant donné le rôle limité du MTP dans la présentation des lipides à l'apo B dans le processus d'assemblage des lipoprotéines, certaines études suggèrent que le MTP ne serait pas absolument nécessaire à la production des lipoprotéines riches en apo B. Dans une étude menée par Gordon et al., où l'ADNc (ADN complémentaire) du MTP et l'apo B-53 ont été transfectés dans les cellules HeLa, la présence de particules lipoprotéïnémiques dans le milieu de culture a pu être notée. Or, des traces d'apo B-53 dans le milieu de culture des cellules contrôles, exempte de MTP, pouvaient être observées, suggérant ainsi que le MTP n'est pas essentiel au processus d'assemblage, mais augmente considérablement l'efficacité de ce processus jusqu'à 30 fois plus (36). Herscovitz et al. ainsi que Gretch et al. ont également confirmé ces observations en utilisant différentes lignées cellulaires. (47,40). Des travaux impliquant des sujets abetalipoprotéïnémiques ont supporté l'hypothèse que le MTP pourrait ne pas être absolument nécessaire à l'assemblage des lipoprotéines. Quoique l'apo B soit difficilement détectable dans le plasma de ces patients, il est possible de constater un faible niveau de lipoprotéines riches en apo B (80,1). Dans des conditions similaires à celles observées chez les patients atteints d'ABL, Raabe et al. ont établi que la concentration d'apo B chez des souris où le gène du MTP a été supprimé (knockout), n'était pas très différente de celle des animaux contrôles. Chez certains des animaux mutés, on peut observer jusqu'à 50% de réduction de l'apo B-48 alors que chez d'autres, on n'observe aucune diminution (94). Par contre, les études menées par Chang et al. démontrent une réduction marquée de l'apo B-48 et une disparition de l'apo B-100 chez les souris où l'activité du MTP a été réduite presque entièrement. Il semble que la sécrétion de l'apo B-100 est ralentie avec la diminution de l'activité du MTP et ce résultat semble consistant. Néanmoins, des études in vivo et cellulaires soulignent un effet variable de la diminution du MTP sur la sécrétion de l'apo B-48 (23). Nous constatons ainsi que les résultats sont très variables d'une étude à une autre

probablement à cause de différentes procédures ou techniques. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'éclaircir ces ambiguïtés. En somme, l'ensemble de ces travaux laisse entrevoir la possibilité que le MTP n'est peut-être pas essentiel à l'assemblage des lipoprotéines, mais sa présence augmenterait substantiellement l'efficacité de ce processus (130).

2.2.3) Inhibiteurs du MTP dans le traitement de l'hyperlipidémie

Les lipoprotéines riches en apo B telles que les chylomicrons (CM), les VLDL et leurs dérivés sont reconnus pour promouvoir l'athérosclérose et augmenter l'incidence des maladies coronariennes. Cependant, l'identification du MTP en tant que facteur responsable causant l'ABL suggère que l'inhibition du MTP atténuerait considérablement la production de CM et de VLDL et abaisseraient les niveaux de lipides plasmatiques chez les animaux. Quoique qu'il y ait eu plusieurs inhibiteurs du MTP produits et utilisés pour limiter la formation des lipoprotéines dans les différents modèles cellulaires, il existe peu d'études démontrant les effets de ces inhibiteurs du MTP in vivo. Une étude effectuée par le groupe de Wetterau a démontré une inhibition de la production de CM et de VLDL chez les rats et un niveau considérablement diminué de cholestérol et de triglycérides plasmatiques chez les hamsters et les lapins WHHL (Watanabe-heritable hyperlipidemic) (modèle pour l'étude de l'hypercholestérolémie homozygote familiale chez l'humain) suite à l'administration d'un inhibiteur du MTP. Les lapins WHHL possèdent une déficience génétique au niveau du récepteur aux LDL ce qui résulte en un niveau de triglycérides et de cholestérol élevé (≥ 300 et ~ 700 mg/dl respectivement). L'inhibiteur du MTP a permis de normaliser le niveau de lipides plasmatiques dans ce modèle largement utilisé par la communauté scientifique (131). Dernièrement, une étude menée par Dupont et al. a montré qu'un récent inhibiteur de MTP, le R-103757, permet la diminution du niveau de cholestérol et de triglycérides plasmatiques chez les humains, ce qui évoque la possibilité que cette approche thérapeutique pourrait éventuellement être efficace pour le traitement des hyperlipidémies chez les humains (33).

2.3) Structure protéique et génétique du complexe MTP

2.3.1) Structure hétérodimérique

Wetterau et Zilversmit ont été les premiers à identifier, en 1984 (123), un complexe protéique isolé de fractions microsomiales hépatiques de bovin, mieux connu aujourd'hui sous le nom de MTP (124). Cette protéine, responsable du transport des triacylglycérols, du cholestérol ester et des phospholipides entre les membranes, a également été retrouvée dans la lumière du réticulum endoplasmique de foie et d'intestin chez le rat (125). C'est grâce aux études permettant l'isolation du MTP qu'ils ont réussi à le caractériser (tableau III). Le MTP purifié de foie de bovin consiste en un complexe protéique de 150 000 kDa. Cette protéine possède une structure différente des protéines monomériques de transfert des lipides, notamment les protéines de transfert de lipides intracellulaires et la protéine de transfert du cholestéryl ester (CETP) (132), puisqu'elle est constituée d'un hétérodimère dans lequel la large sous-unité de 97 kDa possède l'activité de transfert des lipides, tandis que la petite sous-unité est identique à la protéine disulfide isomérase (PDI) (126). Cette dernière constitue une protéine abondante et ubiquitaire présente en grande concentration dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) de la plupart des tissus, où elle assure de multiples fonctions. Elle joue un rôle important dans la maturation des protéines résidentes et sécrétrices du RE et permet la formation de liens disulfides, l'isomérisation et la réduction au niveau du RE. Ce peptide, en plus d'être associé au MTP, constitue un membre de la super-famille des thioredoxines (14). Le PDI est une composante de l'enzyme tétramérique, la prolyl 4-hydroxylase qui elle-même, est constituée de deux sous-unités alpha et de deux sous-unités beta, ces dernières étant identiques au PDI. Celui-ci agit également en tant que sous-unité β du tétramère prolyl 4-hydroxylase $\alpha_2\beta_2$ des vertébrés (92) et du dimère $\alpha\beta$ prolyl 4-hydroxylase de *C.elegans* (*Caenorhabditis elegans*) (117). Son activité disulfide isomérase permet de paier les résidus cystéines des protéines nouvellement

Tableau III. Caractéristiques du Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP)

<u>Propriétés</u>	<u>Large sous-unité du MTP</u>	<u>Protéine Disulfide Isomérase (PDI)</u>
Structure protéique hétérodimère (150 000 kDa) protéine humaine	97 kDa constituée de 894 acides aminés	58 kDa constituée de 508 acides aminés (incluant un peptide signal de 17 acides aminés)
Structure génétique localisation	position 4q24 du chromosome 4	chromosome 17
gène	55 à 60 Kpb (18 exons et 17 introns)	16,5 à 18 Kpb (11 exons et 10 introns)
promoteur	élément de réponse + et - (chol et insuline) séquence de reconnaissance pour HNF-1, HNF-4 et AP-1 (région -123 à -85)	élément de contrôle transcriptionnel: 6 CCAAT boxes (-108 à -378), élément TATA, 2 GC boxes
polymorphismes	Au niveau du promoteur: - 493 G/T, - 400 A/T, - 164 T/C,	-
Famille	famille de la vitellogénine	super-famille des thioredoxines
Fonction	confère l'activité de transfert des lipides au complexe protéique	maintien la forme catalytique de la protéine forme des liens disulfides pour le repliement de la protéine
Localisation	Le complexe MTP facilite la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines riches en apo B en transférant à cette dernière les triacylglycérols, les phospholipides et le cholestérol nouvellement synthétisés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique	Le complexe MTP est principalement localisé dans la lumière des microsomes isolés de foie et d'intestin
Pathologie	Abetalipoprotéïnémie: causée par une déficience génétique au niveau de la large sous-unité du MTP (18 mutations différentes connues), ce qui empêche le PDI de s'y fixer pour former le complexe MTP	

synthétisées pour former des liens disulfides. Le PDI est composé de quatre domaines thioredoxines desquels le premier et le quatrième contiennent une copie de la séquence du site actif –Cys-Gly-His-Cys-. Le pKa acide, et donc la réactivité de l'acide aminé Cys terminal des deux sites, contribue à l'activité redox et isomérase du PDI. Certaines observations suggèrent la possibilité que seulement une des deux séquences –Cys-Gly-His-Cys- soit impliquée dans l'activité catalytique (118). Vuori et al. ont voulu déterminer si les deux séquences correspondaient au site catalytique responsable de l'activité isomérase et si elles agissaient indépendamment ou en coopération. Puisque la modification d'un des sites catalytiques a mené à la perte de la moitié de l'activité isomérase et que la modification des deux sites à une perte totale de l'activité du PDI, ils ont conclu que les deux séquences –Cys-Gly-His-Cys- constituent un site essentiel pour l'activité isomérase et que ces deux sites catalytiques du PDI semblent fonctionner indépendamment l'un de l'autre (118). En promouvant la formation de liens disulfides et en bloquant les liens disulfides incorrects, le PDI permet aux protéines d'éviter d'être emprisonnées dans un état intermédiaire de repliement défectueux ou de s'agréger à d'autres protéines. Le PDI a la possibilité de se lier à d'autres peptides ou encore de servir de chaperon, rôle indépendant de son activité disulfide isomérase, ce qui semble contribuer au repliement adéquat des nouvelles protéines synthétisées (14).

L'ADN complémentaire (ADNc), qui permet de déterminer la séquence d'acides aminés composant la large sous-unité du MTP, a été isolé et cloné par Sharp et al. (101). Cette étude a montré une homologie de 88% entre le l'ADNc du MTP humain et celui de bovin (101) et d'hamster (71). Subséquemment, le gène codant pour la large sous-unité du MTP a été caractérisé chez l'humain et sa localisation déterminée soit à la position 4q24 du chromosome 4 (102). Le gène du MTP est constitué de 18 exons et s'étend sur environ 55 à 60 Kpb (figure 7). La large sous-unité du MTP de la souris (82) et du poulet (54) a également été clonée récemment. La protéine humaine entière est composée de 894 acides aminés et cette protéine native possède un poids moléculaire de 99 kDa. La portion aminoterminal de la protéine est hydrophobe et constitue un peptide signal de 18 acides aminés (132,14). Le clivage de ce dernier se manifeste après le 19^e acide aminé, produisant ainsi un polypeptide mature de 97 kDa (130). Il semble que ce peptide

signal serait requis pour l'insertion co-traductionnelle de l'apolipoprotéine B dans le feuillet interne de la membrane du RE (91).

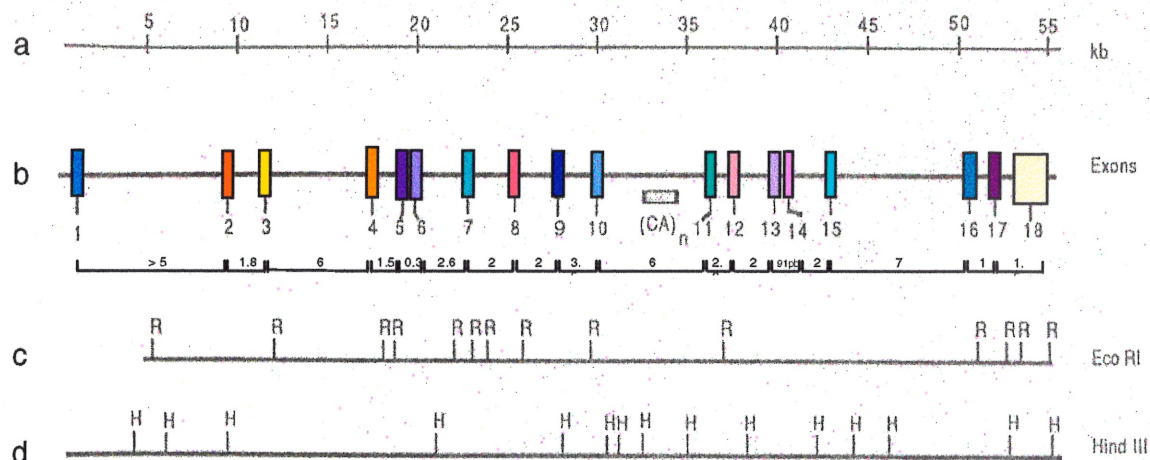


Figure 7. Organisation du gène de la large sous-unité du MTP. La ligne supérieure illustre la distance génomique en kilobases (a). Les 18 exons composant le gène sont représentés en (b) où la taille des 17 introns peut également être observée. La troisième et la quatrième ligne correspondent aux sites de restriction de EcoRI (R) et de HindIII (H) respectivement (c, d). (adaptée de Sharp et al. 1994).

Quant au PDI, elle est localisée sur le chromosome 17 humain (102). Le PDI est constitué de 491 résidus d'acides aminés et d'une séquence signal de 17 acides aminés additionnels. Le gène du promoteur du PDI humain contient plusieurs éléments cis incluant six éléments CCAAT parmi le premier 378 nt (figure 8). Il semble que ces éléments régulateurs soient importants pour l'expression efficace du PDI, quoique certains d'entre eux soient redondants. L'existence d'au moins 11 sites d'interactions protéine-ADN dans le promoteur du PDI humain démontre la complexité de la régulation de l'expression du gène du PDI (112).

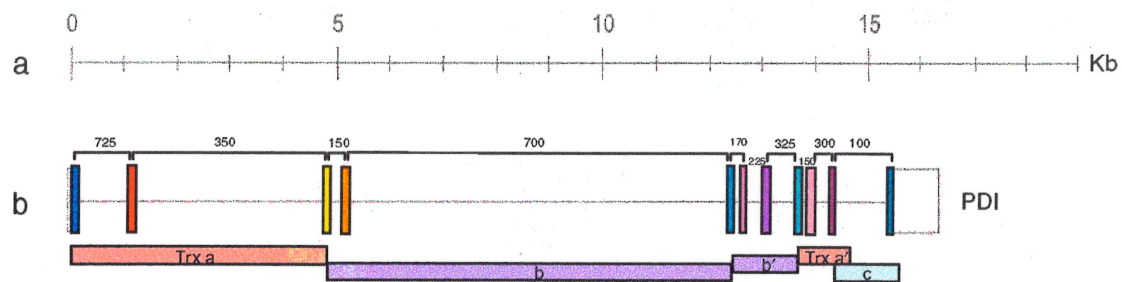


Figure 8. Organisation du gène du PDI. La ligne supérieure illustre la distance génomique en kilobases (a). Les 11 exons composant le gène sont représentés en (b) où la taille des 10 introns (pb) peut également être observée. Les régions génomiques correspondant aux sites thioredoxin actif sont indiquées par l'annotation Trx a et Trx a'. (adaptée de Koivunen et al. 1997).

2.3.2) Structure tertiaire de la large sous-unité du MTP

Quoique la sous-unité de 97 kDa ne soit pas très homologe aux autres protéines connues, Shoulders et al. ont prédit, basé sur la similarité de la séquence, la structure moléculaire et la comparaison des structures génétiques, que le MTP est génétiquement un membre de la famille de la vitellogénine (107). Cette observation a été appuyée par des données cristallographiques obtenues par rayon X, indiquant que le MTP et la lipovitelline ont un repliement structural similaire (113) (figure 9). Le complexe de lipovitelline de lamproie, formé à partir du clivage génétique de la vitellogénine, forme un homodimère. Il est composé d'une région amino-terminale tonneau β , suivi par une structure en hélice- α et d'une cavité liant les lipides, contenant 2 feuillets plissés- β , à la portion carboxy-terminale (3). Les deux monomères interagissent par un contact entre leurs structures tonneau β et hélice- α (14). Dans le modèle de Mann et al., le domaine amino-terminal du MTP (les résidus d'acides aminés 34-263) a 13 brins β et correspondent à la structure tonneau de la lipovitelline. Ceci est suivi par un domaine hélice- α (résidus d'acides aminés 304-598). Une approche expérimentale utilisant la co-expression a été utilisée pour procurer la preuve que la large sous-unité du MTP interagit avec le PDI via le domaine hélice- α (76,14).

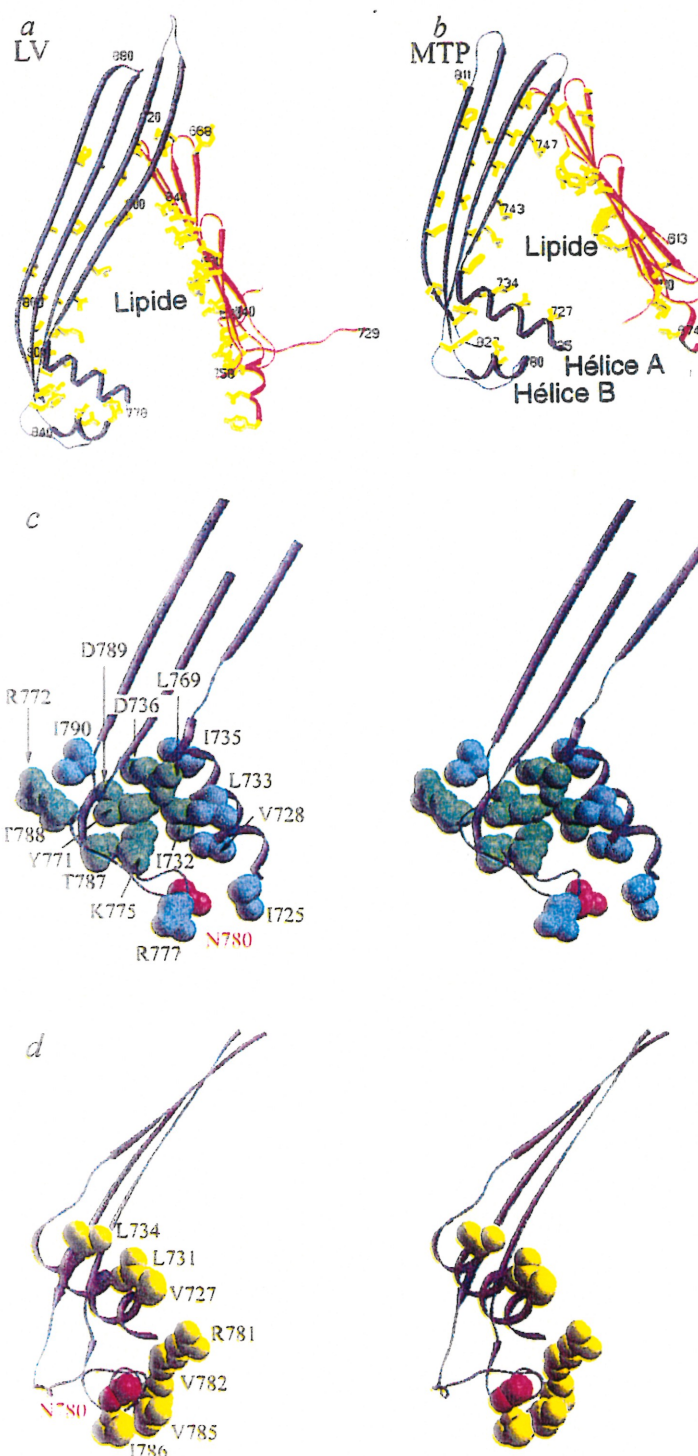


Figure 9. Diagrammes de la cavité liant les lipides de la lipovitelline (LV) et du MTP. a, illustration des brins- β 2-7 du feuillet C de la lipovitelline de lamproie (rouge), des brins- β 2-5 et des hélices A et B du feuillet A (bleu). b, modèle moléculaire de la cavité liant les lipides du MTP. c, représentation de la fente située entre les hélices A et B du MTP. L'Asp⁷⁸⁹ (vert) participe au réseau d'interactions qui permet la stabilisation des hélices A et B. d, schéma du sillon hydrophobe (jaune) formé par les hélices A et B à l'interface eau-lipide de l'ouverture de la cavité liant les lipides du MTP. (adaptée de Read et al. 2000).

2.3.3) Caractéristiques de la cavité du MTP liant et transportant les lipides

2.3.3.1) Les propriétés de transport des lipides du MTP

Le complexe MTP catalyse le transport d'une grande variété de molécules neutres et de phospholipides dans les études *in vitro*. Afin de mieux définir la nature des sites sur le MTP qui lie et transporte les lipides, le taux de transport des lipides de structures différentes par le MTP a été comparé. L'activité de transfert du MTP est déterminée par la mesure du taux de transfert des triglycérides radiomarqués d'une vésicule donneuse (suv) à une vésicule acceptrice (suv) (128).

Le MTP forme un complexe stable avec une variété de lipides neutres (TG, CE, DAG) et de phospholipides (PC, PE, PS, PI) (5,56). Des études en fluorométrie, capables de mesurer le transport des lipides d'une membrane donneuse vers le MTP, ont démontré que le MTP lie rapidement les lipides marqués par la fluorescence soient les TG, CE et PC (4,5). La liaison et le transfert des TG par le MTP sont dépendants de la concentration des TG dans la membrane donneuse. Une augmentation de la concentration en TG dans les membranes accroît à la fois la liaison des TG au MTP et le nombre de molécules de TG transportées d'une membrane donneuse vers une membrane acceptrice (5). Ceci suggère que l'habileté du MTP à transporter les molécules de lipides est liée à sa capacité à les lier. Lorsque la liaison d'une variété de différentes molécules de lipides au MTP a été étudiée, une relation linéaire a été observée entre la liaison des différentes molécules de lipides au MTP et le taux relatif de transfert par le MTP (56). Ainsi, l'habileté du MTP à lier les molécules de lipides à la surface membranaire semble gouverner leur taux de transfert par le MTP. L'étroite relation entre la capacité du MTP à lier et à transporter les molécules de lipides est consistante avec le mécanisme proposé de transport des lipides par navette (130).

L'habileté du MTP à transférer différents types de molécules de lipides a été étudiée en détail afin de déterminer si un changement dans la structure d'une molécule de lipide affecte son transport par le MTP. Jamil et al. ont incorporé différents lipides neutres et des phospholipides dans des membranes donneuses et ont mesuré leur taux de transfert. Il s'est avéré que le taux relatif de transfert, représentant l'interaction entre une molécule de lipide et le MTP, diminue dans

l'ordre suivant : TG >CE>DAG>PC. Le MTP a montré une préférence marquée pour le transport des lipides neutres entre les membranes. De plus, le retrait d'une chaîne d'acide gras des TG, CE ou PC pour former des DAG, cholestérol ou lyso-PC, respectivement, résulte en une baisse du taux de transport des lipides de 90% indiquant que l'hydrophobicité d'une molécule lipidique, sans considérer la classe de lipide, joue un rôle prépondérant dans le transfert médié par le MTP (56). Quoique le MTP transporte une grande variété de phospholipides, lesquels possèdent une tête de structure et de charge différente (négative, positive ou neutre), ils sont tous transportés à un taux équivalent suggérant qu'il n'y a pas d'interactions spécifiques, structurales ou charge-charge entre le MTP et le groupe polaire de la tête d'une molécule de phospholipide (56). La cavité liant les lipides du MTP, qui permet la liaison des lipides et leur transport, semble être flexible et de nature hydrophobique et c'est pour cette raison qu'elle peut lier une variété de molécules lipidiques à la fois neutres et polaires (130).

2.3.3.2) Les sites de liaison aux lipides du MTP

Les études portées sur les caractéristiques de la cavité du MTP liant et transportant les lipides ont démontré qu'il existe deux sites de liaison aux différentes classes de lipides au niveau du MTP (5). Ces sites diffèrent par la vitesse à laquelle ils transportent les lipides entre le MTP et une membrane ainsi que par la spécificité et l'affinité de liaison aux classes de lipides qu'ils transportent. Le premier site transporte rapidement les lipides neutres et les phospholipides entre le MTP et une membrane. Ce site rapide semble constituer le site primaire impliqué dans le transfert de ces deux types de lipides. Le second site du MTP liant les lipides transporte lentement les molécules de lipides entre le MTP et une membrane. Ce dernier semble être sélectif pour les phospholipides. Son rôle exact n'a pas encore été déterminé (5).

Une étude menée par l'équipe de Shoulders a utilisé un modèle moléculaire afin d'obtenir les informations additionnelles pour mieux comprendre les mécanismes dictant la formation du complexe MTP-PDI et le transfert des lipides de leur site de synthèse vers l'apolipoprotéine B durant l'assemblage des lipoprotéines. Il semble que le MTP possède un peptide de fusion à l'entrée de la cavité

hydrophobe du MTP liant les lipides, lequel s'insère dans la membrane lipidique afin de perturber l'orientation des chaînes acyls des phospholipides. La formation d'une phase thermodynamique instable pourrait exposer les chaînes acyls des lipides neutres et des phospholipides à l'interaction avec l'une des hélices α de la cavité hydrophobe liant les lipides du MTP. Ils ont également spéculé que l'extraction des lipides neutres d'une membrane serait d'avantage facilitée par l'interaction électrostatique entre l'Arg⁷⁸¹ d'une des hélices α et les charges négatives sur les groupes phosphates des molécules de phospholipides composant la bicouche. Ces interactions devraient augmenter l'affinité de la cavité du MTP à lier les lipides (95).

2.3.4) Interaction entre la large sous-unité du MTP et le PDI

Le MTP, comme décrit plutôt, est un dimère $\alpha\beta$, où le peptide de 97 kDa correspond à la sous-unité α et le petit peptide de 58 kDa à la sous-unité β . (130) L'interaction entre le PDI et la large sous-unité du MTP semble être irréversible et de nature non covalente. L'analyse structurale de ces deux sous-unités dans la protéine mature confirme un ratio 1 : 1 (127,4). Cette étroite association entre les deux sous-unités du complexe MTP a été démontrée par l'utilisation d'anticorps pour chacune des sous-unités, qui, une fois additionnés au MTP en solution, permettent la neutralisation des deux sous-unités, et ainsi l'inhibition de l'activité de transfert des triacylglycérols (126). De plus, Wetterau et al. ont démontré que la dissociation du complexe MTP par un traitement avec des agents dénaturants, des détergents non dénaturants ou des agents chaotropiques, à de faibles concentrations, a entraîné une perte d'activité du complexe et à l'agrégation de la large sous-unité de 97 kDa, confirmant sa nature hydrophobe, et suggérant ainsi que la présence du PDI est requise et essentielle au maintien de la structure active du MTP (127). La nature insoluble de la large sous-unité du MTP laisse supposer qu'elle s'associe au PDI de façon co-translationnelle ou par l'intermédiaire d'un complexe protéique de type chaperon (130). Des études d'expression montrant que la portion C-terminale de la large sous-unité du MTP est requise pour la formation du complexe MTP indiquent que la protéine entière doit être traduite avant de pouvoir former un complexe avec le PDI (97).

L'importance de la présence du PDI au complexe MTP a été illustrée dans une étude d'expression utilisant une lignée cellulaire (Sf9) provenant d'insectes et le système d'expression baculovirus. Ils ont démontré que lorsque les cellules Sf9 étaient infectées par un virus exprimant la large sous-unité du MTP seulement, l'activité du MTP n'était pas détectable et la protéine était sous une forme insoluble agrégée. Par contre, lorsque les cellules Sf9 étaient co-infectées avec un virus exprimant à la fois le MTP et le PDI, une activité de transfert pouvait être détectée et les sous-unités représentaient des fractions solubles. Cette étude confirme ainsi la présence primordiale du PDI pour le maintien de la structure et de l'activité du complexe MTP (97). La forme catalytique active du PDI ne semble cependant pas requise pour l'activité du complexe MTP. La co-expression de la large sous-unité du MTP et d'une forme artificielle mutée du PDI dans des cellules d'insectes, où les sites catalytiques ont été inactivés, a démontré la présence de la forme dimérique du MTP soluble qui possède une activité de transfert des lipides comparable au complexe protéique sauvage (64). Une autre étude effectuée par Wetterau et al. a montré que l'activité disulfide isomerase du PDI, lorsque complexé à la large sous-unité du MTP, ne constitue qu'un dixième de l'activité du PDI sous forme libre. Par contre, lorsque le PDI est dissocié du complexe MTP, elle retrouve son activité disulfide isomerase, comparable à la forme libre authentique (126).

Le PDI comprend deux sites actifs identiques à ceux de la thioredoxine, localisés à la position des acides aminés 35-40 et 379-384 des 491 acides aminés de la protéine entière. Ce sont ces sites qui confèrent l'activité disulfide isomerase de la protéine. Il semble que l'association du PDI à la large sous-unité du MTP bloque l'accessibilité du PDI à ces deux sites actifs ou encore, la large sous-unité du MTP modifie la conformation du PDI de façon à ce qu'elle perde son activité (130). Il semble ainsi que le PDI accomplirait une fonction similaire à celle retrouvée au niveau de la prolyl 4-hydroxylase où, en tant que sous-unité β , son activité isomerase catalytique n'est pas requise pour l'assemblage du tétramère ou pour l'activité hydroxylase, mais cette protéine est critique pour maintenir la sous-unité α -hydroxylase dans une conformation catalytique et non agrégée (132). Le site de liaison peptidique du PDI se situe dans la portion C-terminale de la protéine et il est encore incertain si ce site de liaison joue un rôle dans l'association du PDI à la large sous-unité du MTP (85).

Il est cependant évident que le PDI joue un rôle structural dans le complexe MTP en maintenant la large sous-unité sous une forme soluble. Il est également possible que le PDI joue un rôle au niveau du ciblage du MTP au niveau du réticulum endoplasmique. Le complexe MTP utiliserait probablement la séquence KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) retrouvée sur la portion C-terminale du PDI qui permettrait la rétention des protéines nouvellement synthétisées dans le RE. Cette séquence d'acides aminés que l'on retrouve sur la portion C-terminale de plusieurs protéines résidentes du RE, médie la liaison à un récepteur localisé dans le compartiment intermédiaire (ERGIC : ER-Golgi intermediate compartment). Une fois liée, la protéine est transportée à nouveau dans le RE où elle est relâchée. Cette séquence n'est pas retrouvée sur la large sous-unité du MTP (101).

2.3.5) Les sites de liaison à l'apolipoprotéine B du MTP

L'apolipoprotéine B constitue une protéine structurale essentielle pour l'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides. L'apo B-100 dans le foie est composé de 4536 acides aminés et l'apo B-48 dans l'intestin de 2152 acides aminés (50). On croit que l'apo B (native) peut être lipidée avant même que sa synthèse soit complétée. Cette lipidation précoce requière la présence du MTP (130). Une corrélation directe entre l'activité du complexe MTP et l'assemblage des lipoprotéines a été établie par diverses études qui ont démontré, *in vitro*, la co-expression du MTP et de l'apo B dans des lignées cellulaires qui ne sécrètent pas normalement de lipoprotéines (120,90,40,65,36). Il a été suggéré que le MTP participerait à la translocation de l'apo B native, de la membrane du RE vers le portion luminale, ce qui suggère que le MTP pourrait jouer le rôle d'une chaperon, tôt dans la translocation de l'apo B à travers la membrane du RE (40). De plus, il semble que la translocation et la sécrétion de l'apo B nécessiteraient l'interaction entre le MTP et la portion N-terminale (18%) de l'apo B. Cette interaction entre l'apo B et le MTP a été démontrée par une technique de co-immunoprécipitation (90,133). Une étude subséquente menée par Hussain et collègues (51) a permis de mieux caractériser l'interaction existant entre l'apo B et le MTP. Ils ont constaté que les résidus lysine et arginine, chargés positivement et situés dans les 18% de la portion N-terminale de l'apo B étaient cruciaux à l'interaction de grande affinité et de

nature ionique avec le MTP, confirmant les observations de plusieurs autres études (90,6,40). L'interaction entre l'apo B et le MTP est favorisée par la présence de détergents indiquant que la délipidation de l'apo B résulte en une meilleure interaction avec le MTP. Cette étude suggère ainsi que l'interaction MTP-apo B précède probablement la lipidation du polypeptide de l'apo B native puisque sa lipidation empêche l'interaction avec le MTP, ce qui contribuerait à la dissociation du MTP de la lipoprotéine en formation.

D'autres travaux ont démontré plus précisément la localisation du site de liaison sur le polypeptide de l'apo B qui lie le MTP. Utilisant plusieurs petits polypeptides d'apo B, Hussain et al. ont observé que les acides aminés 430-570 du domaine α 1-globulaire de l'apo B jouait un rôle crucial dans l'interaction entre l'apo B et le MTP (52). Cette étude a été supportée par les observations de Bradbury et collègues, où les mêmes conclusions ont pu être tirées par l'utilisation d'une analyse mutationnelle dans un système double hybride chez la levure. Ils ont démontré que le MTP interagissait avec l'apo B via deux sites différents, c'est-à-dire au niveau des résidus d'acides aminés 1-264 et au niveau 512-712. La localisation de ces deux sites de liaison sur l'apo B et le MTP servirait à aligner l'apo B native dans une orientation tête-à-tête avec le MTP. Ceci permettrait le positionnement du domaine de liaison du MTP aux lipides avec la structure de liaison de l'apo B aux lipides et faciliterait ainsi le transfert des lipides du MTP à l'apo B. De plus, ces travaux ont permis de constater qu'un des sites de liaison pour l'apo B était localisé à proximité du site de liaison pour le PDI. Des expériences additionnelles seraient par conséquent nécessaires pour établir de quelle façon cet arrangement facilite l'assemblage de la lipoprotéine (18).

Ainsi plusieurs études, effectuées dans différents systèmes, ont procuré de solides évidences que la portion N-terminale de l'apo B joue un rôle important pour sa liaison au MTP. Il est alors possible de supposer que l'initiation de la lipidation de l'apo B se produit via une interaction physique directe avec le MTP. L'addition de lipides permet aux surfaces hydrophiles du domaine amphipatique de liaison aux lipides de l'apo B, de s'orienter vers le milieu aqueux de la lumière du RE alors que les surfaces hydrophobes s'orientent vers le centre où le cœur de lipides neutres est déposé. Il en résulte la formation d'une particule lipoprotéinémique native dense

stable, riche en apo B, qui est capable de recevoir une grande quantité de lipides neutres lors d'étapes subséquentes dans la voie de synthèse des lipoprotéines (38,7).

2.3.6) Les polymorphismes du MTP

L'analyse de l'organisation du gène du MTP, de la structure du promoteur et de la séquence codant pour la protéine chez diverses espèces, révèle que le gène du MTP est conservé à travers l'évolution (42). De plus, les études de transfections ont permis d'établir que l'activité du promoteur du MTP humain est régulée par le cholestérol et l'insuline (positivement et négativement, respectivement) (42,74). Il existe également certaines évidences que des facteurs génétiques peuvent moduler l'activité du MTP. Une étude récente menée par Karpe et al. a démontré pour la première fois que le polymorphisme fonctionnel commun dans la région du promoteur du MTP, le G493T (substitution de G-à-T à la position -493 du promoteur du MTP), influence l'activité de transcription dans les cellules HepG2 et est associé à des variations significatives de la concentration des LDL-cholestérol et de la composition en apo B des sous-fractions des VLDL, chez les hommes en santé d'âge moyen. Ils ont rapporté que la construction minimale du promoteur, contenant la variation -493T du polymorphisme du MTP, augmentait l'activité transcriptionnelle du gène rapporteur chloramphinicol acétyltransférase, lorsque transfecté dans les cellules HepG2. De plus, ils ont démontré que les sujets homozygotes pour l'allèle variant du MTP -493T avaient des concentrations significativement plus basses en LDL-cholestérol comparativement aux sujets hétérozygotes ou aux sujets homozygotes pour l'allèle variant du MTP -493G. L'allèle du MTP -493T est également associé à une diminution significative du contenu de l'apo B des VLDL et LDL en plus d'une augmentation du ratio triglycéride/apo B dans ces lipoprotéines (60).

Juo et al. ont également observé une différence significative chez les patients homozygotes pour le polymorphisme du promoteur du MTP -493TT, mais les résultats obtenus vont dans le sens inverse de ceux obtenus par Karpe et al. Ils démontrent que chez une population d'hommes Africains Américains possédant le génotype homozygote TT, on peut constater une augmentation du niveau de

cholestérol total, de LDL-cholestérol et du niveau d'apo B (59). Évidemment, ces deux études comportent plusieurs différences relatives à la taille de l'échantillonnage, la race, l'âge, et l'indice de masse corporelle (IMC) des sujets ainsi que d'autres facteurs environnementaux.

Par contre, Herrmann et al. ont plutôt observé qu'il n'y a pas de relation significative entre les deux polymorphismes du promoteur du MTP A-400T et T-164C et de variations au niveau du profil lipidique et du risque de maladies cardiovasculaires (46). De façon similaire, l'étude menée par Couture et al. a montré qu'il n'y a pas d'association significative entre le polymorphisme du promoteur du MTP G-493T et la variation des niveaux de lipides et d'apoprotéines, le profil des sous-classes de lipoprotéines, la taille des particules de lipoprotéines et le risque de maladies cardiovasculaires (24). Il serait concevable de penser que le polymorphisme G-493T dans la région du promoteur du MTP puisse moduler la transcription du gène et, par conséquent, l'assemblage et le transport des lipoprotéines riches en apo B. Cependant, Hagan et al. ont récemment comparé la transcription des gènes du MTP du hamster et de l'humain et n'ont pas trouvé de régions régulatrices en amont de la paire de base -239 à partir du site de transcription initial. Ce groupe a démontré que la déplétion de la séquence 5' à la paire de base -239, dans les cellules HepG2, n'avait aucun effet sur l'activité du promoteur du MTP (42). L'inconsistance de ces résultats dans l'association entre les polymorphismes du promoteur du MTP et les variations dans le profil lipidique peut être reliée à divers facteurs tels que la différence entre les populations testées, les facteurs environnementaux et les différences génétiques chez les populations étudiées.

Chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (HF), un désordre autosomal dominant causé par une mutation de la région codant du gène du récepteur aux LDL, on peut observer un niveau excessif de LDL dans le plasma, ce qui s'avère un risque élevé pour le développement des maladies cardiovasculaires. Comme l'étude de Karpe et al. a démontré que le polymorphisme du promoteur du MTP -493T pouvait agir sur le profil lipoprotéinique en diminuant le taux de LDL-cholestérol plasmatique, Lundahl et al. ont voulu vérifier si ce polymorphisme du MTP pouvait avoir le même effet chez les patients atteints de HF. Ils ont constaté

que ce polymorphisme permettait une diminution du taux de triglycérides plasmatiques, mais que l'effet sur le niveau des LDL n'était pas significatif dans la population d'HF. Les résultats de cette étude comportent une importance clinique puisque les sujets atteints d'HF combinée à une hyperlipidémie ou plus spécifiquement à une hypertriglycéridémie, voient le risque de développer des maladies cardiovasculaires augmenter comparativement au cas isolé d'hypercholestérolémie. Or, le polymorphisme du promoteur du MTP -493TT, semble agir en tant que modulateur du phénotype lipoprotéinique des sujets atteints d'HF, en diminuant le taux de triglycérides plasmatiques observé chez ces patients ce qui pourrait contribuer à la diminution des risques de développement des maladies cardiovasculaires chez ces patients (74).

En bref, l'ensemble des travaux effectués au niveau du gène du MTP nous a clairement démontré l'existence d'importants sites de régulation potentiels dans la région du promoteur. L'induction de ces derniers par des effecteurs qui leur sont spécifiques semble moduler l'expression du MTP et conséquemment, la production des lipoprotéines. Plusieurs études ont ainsi tenté d'élucider les mécanismes de régulation du MTP, responsables des réponses physiologiques observées suite à la stimulation de ces différentes régions du promoteur.

3. Régulation du MTP au niveau de l'entérocyte

La caractérisation du gène du MTP a permis d'identifier plusieurs régions du promoteur auxquelles se lient des facteurs de transcription spécifiques, notamment le HNF-1 (hepatic nuclear factor), le HNF-4 et la AP-1 (activator protein), contrôlant ainsi la transcription et l'expression du gène (42). Les HNF-1 et HNF-4 sont majoritairement exprimés dans le foie où ils modulent l'expression de divers gènes, mais ils sont également localisés dans l'intestin et les reins. Le HNF-4 est un membre de la super famille des facteurs de transcription du récepteur aux hormones stéroïdiennes dont certains d'entre eux semblent répondre aux acides gras. De ces observations, on pourrait raisonnablement supposer que l'expression du MTP puisse être gouvernée par les lipides (132). Il est aussi à noter que le HNF-4 représente un activateur puissant des gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines, incluant l'apo A-I, l'apo C-III et l'apo B. Le HNF-1 et le HNF-4 sont associés dans un cycle d'auto-régulation dans lequel le HNF-1 modifie à la baisse la transcription de l'apo A-I et de l'apo C-III souvent activée par le HNF-4 (42). En plus de comporter les séquences de reconnaissance pour ces facteurs de transcription, le promoteur possède un élément de réponse négative à l'insuline ainsi qu'un élément de réponse au stérol, suggérant que l'expression du gène du MTP est négativement contrôlée par l'insuline et positivement contrôlée par le cholestérol (14,42). À la lumière de ces connaissances, diverses études ont tenté d'élucider la régulation du MTP en examinant l'effet de différents facteurs sur la transcription du gène du MTP (tableau IV).

3.1 Lipides alimentaires

Étant donné le rôle crucial du MTP dans le processus d'assemblage des lipoprotéines riches en apo B, il semble évident que tout changement au niveau de cette protéine de transfert peut entraîner des altérations dans la synthèse de ces véhicules lipidiques. D'un autre côté, plusieurs travaux ont procuré

Tableau IV. Régulation du Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) et de l'apolipoprotéine B

Régulateurs	MTP		apo B		Mécanismes	
	ARNm	protéine	activité	ARNm		protéine
Lipides diététiques						
Cholestérol	↑	↑	ND	φ	ND	↑
acide gras saturés	↑	↑	ND	φ	φ	↑
acides gras insaturés	↑	↑	ND	φ	φ	↑
acide eicosapentanoïque	↓	φ	ND	↓	φ	↓
Hormones						
Insuline	↓	φ	φ	↓	φ	↓
				ND	long terme	↑
						apo B: 1) ↑ du niveau de TG cellulaire ↓ la dégradation intracellulaire de l'apo B (26,114)
						apo B: la ↓ du niveau de TG, cellulaire ↑ la dégradation intracellulaire de l'apo B (26,93)
						MTP: 1) ↓ transcription au niveau du promoteur (-124 à -109) via le récepteur à l'insuline 2) ↓ de la stabilité de l'ARNm (72,100)
cytokines et endotoxine						
TNF	↓	ND	ND	ND	ND	φ
LPS	↓	ND	ND	ND	ND	φ
IL-1	↓	↓	↓	↑	↓	φ
IL-6	↓	↓	↓	↑	↓	φ
						apo B: ↓ apo B cellulaire via une ↑ de sa dégradation intracellulaire, ⇒ ↑ de l'ARNm (136)
						MTP: 1) ↓ transcription via l'activation d'une séquence de répression à l'éthanol; 2) ↓ de la stabilité de l'ARNm; (73)
Éthanol						
						apo B: 1) ↑ transcription du gène; 2) ↑ de la stabilité de l'ARNm; 3) ↓ dégradation intracellulaire de l'apo B (27,119)

l'évidence que la synthèse et la disponibilité des lipides modulent la production de l'apo B et par conséquent, la formation des lipoprotéines. Il est donc possible de spéculer que des modifications au niveau du MTP altéreraient le taux de transfert des lipides à l'apo B, interférant ainsi avec l'élaboration des transporteurs lipidiques. Lin et al. ont été les premiers à tenter d'élucider les mécanismes de régulation du MTP. L'utilisation de diverses diètes, connues pour modifier le métabolisme des lipides dans le foie et dans l'intestin, ont permis de vérifier leurs effets, durant une période de 31 jours, sur les taux d'ARNm et sur la masse protéique du MTP (71). Dans l'intestin, les niveaux d'ARNm et la masse protéique du MTP répondent à la hausse dans une période de 24 heures subséquente à l'administration de diètes riches en lipides. Dans le foie, la régulation des niveaux d'ARNm s'effectue à plus long terme; elle serait proportionnelle à l'ampleur des lipides présentés et varierait en fonction de la nature des acides gras (130,132,11). Les classes d'acides gras saturés augmentent considérablement les concentrations d'ARNm hépatiques du MTP comparativement aux acides gras mono ou polyinsaturés (11). Cependant, on ignore encore les mécanismes précis régissant la régulation du gène du MTP par les différents types de diète riches en acides gras saturés. Même si de plus en plus de laboratoires adoptent l'hypothèse impliquant le facteur de transcription HNF-4, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour définir les voies régulatrices du MTP par les lipides (132).

Tel que mentionné précédemment, il est possible d'observer au niveau du promoteur du gène du MTP un élément de réponse au stérol suggérant que le cholestérol diététique serait un facteur capable d'influencer les concentrations de MTP. Bennett et al. ont reporté que, suite à l'administration d'une diète enrichie en cholestérol, les niveaux de VLDL-cholestérol et de VLDL-triacylglycérol sont augmentés. De plus, ils sont corrélés avec l'augmentation du niveau d'ARNm hépatique, associée à la hausse des concentrations de cholestérol ester hépatique. Par contre, aucune augmentation significative du niveau d'ARNm de l'apo B a été notée. Les auteurs de cette étude suggèrent que cette apolipoprotéine ne semble pas limitante, du moins dans ce contexte, pour la synthèse et la sécrétion des VLDL (12). Certains travaux ont d'ailleurs mis en évidence que l'apo B était

majoritairement modulée de façon co ou post-transcriptionnelle (88,63). Une des suggestions qui ressortent de ces études est que l'augmentation de l'expression génétique du MTP permet la mobilisation de l'excès de cholestérol afin de prévenir une accumulation exagérée dans le foie. De plus, en vue de l'induction de la phosphatidate phosphohydrolase, une enzyme impliquée dans la régulation de la synthèse du triacylglycérol, on peut raisonnablement proposer qu'une plus grande disponibilité des triglycérides et de l'activité de transfert du MTP stimulerait le foie à incorporer plus de cholestérol dans les VLDL, et une plus grande production de ces dernières (132).

Le cholestérol diététique a donc été identifié comme étant un élément modulateur important de la synthèse de cholestérol endogène. Ce contrôle est attribuable à la variation du niveau d'ARNm codant pour les enzymes multiples impliquées dans la voie de biosynthèse du cholestérol. La SREBP (sterol regulatory binding protein) constitue un facteur de transcription responsable de l'activation de la transcription des gènes codant pour ces enzymes et celles impliquées dans le métabolisme des acides gras. Cette protéine, liée aux membranes du réticulum endoplasmique, doit subir une protéolyse qui lui permet d'acquérir sa forme mature par la libération de son domaine NH₂-terminal actif. Ce dernier pénètre dans le noyau où il active la transcription en se liant à un élément de régulation au stérol (SRE : sterol regulatory element) localisé dans la région du promoteur du gène cible. En présence d'un excès de cholestérol, le processus de protéolyse est inhibé et la SREBP demeure liée aux membranes du réticulum endoplasmique, supprimant ainsi la transcription du gène cible. À l'inverse, un manque de cholestérol favorise l'augmentation du niveau d'ARNm de la SREBP et par conséquent, de la forme précurseur et active de la protéine (105).

Le mécanisme par lequel le cholestérol module l'expression du MTP a été examiné par les travaux de Sato et collègues. Suite à la démonstration d'un effet positif du cholestérol sur l'expression du gène et de la masse protéique du MTP, l'étude du promoteur a été effectuée afin d'identifier la région responsable de la régulation de sa transcription. En plus d'identifier la séquence de réponse au stérol,

la présence de la SREBP a été signalée (100). Ils ont démontré que la SREBP pouvait réguler négativement l'expression du gène du MTP en se liant au SRE de façon spécifique. Cette liaison permet de réguler le MTP à la baisse, comme une privation de cholestérol l'aurait fait (100). Ces observations permettent de supposer que la présence du cholestérol modifie les conditions qui permettent au SREBP et au SRE de se lier, bloquant ainsi la baisse de transcription du MTP médiée par l'union de ces deux protéines. Les travaux de Shimomura et al. ont d'ailleurs démontré qu'une diète enrichie en cholestérol réduisait les niveaux du domaine NH₂-terminal de la SREBP chez le hamster (105). En bref, il semble que la SREBP est d'une importance cruciale pour la régulation de la synthèse du cholestérol et des acides gras et par conséquent, de la production des lipoprotéines via son contrôle sur l'expression du gène du MTP (100).

3.2 Insuline

La caractérisation du promoteur du gène du MTP a permis de repérer un élément de réponse négative à l'insuline présent dans différents types cellulaires, incluant les cellules HepG2. Lin et al. ont voulu utiliser cette lignée cellulaire pour déterminer la régulation du MTP par divers facteurs dont l'insuline (72). Les résultats obtenus, suite au traitement des cellules HepG2 avec l'insuline durant une période de 3 à 24 heures, ont documenté une diminution marquée du niveau d'ARNm du MTP et du PDI. Cette baisse est maximale à 6 heures, mais elle ne modifie pas leur niveau protéique ou l'activité de transfert du MTP. Étant donné la discordance entre la concentration d'ARNm et l'activité du MTP, on peut supposer que le niveau protéique ne dépende pas du niveau d'ARNm. D'ailleurs, afin de pouvoir observer un changement de la masse protéique du MTP et du PDI, il faut que les niveaux d'ARNm en soient modifiés puisque la demi-vie du MTP et du PDI est de 4,4 et 7 jours respectivement. Il est à noter que les quantités protéiques du MTP ne sont pas altérées de façon aiguë par l'insuline, suggérant que la baisse d'expression génique est probablement due à une régulation à la baisse du récepteur à l'insuline ou à une diminution de la stabilité de l'ARNm (72). Brett et al. se sont également intéressés à l'étude de la modulation du gène du MTP chez le

rat diabétique où les cellules β du pancréas ont été détruites par un traitement à la streptozotocin (19). Ce modèle a été utilisé dans le but d'évaluer si la cause d'une diminution des VLDL hépatiques, observés au niveau d'hépatocytes de certains rats diabétiques, était causée par une diminution de l'activité de transfert du MTP. En mesurant l'activité et la masse protéique, suite à un traitement de cinq jours avec la streptozotocin, ils n'ont remarqué aucun changement dans ces deux paramètres. Par contre, les travaux effectués par Wetterau et al. ont permis de noter certaines modifications. Puisque l'insuline abaisse généralement les niveaux d'ARNm du MTP, une diminution de cette hormone devrait à l'inverse augmenter la transcription du gène (35). Or, les travaux effectués par Wetterau et al. démontrent justement une augmentation de 65% des concentrations d'ARNm hépatiques, suite à un traitement de huit jours avec la streptozotocin, alors qu'aucun effet n'a été noté pour les niveaux d'ARNm de l'intestin (130). Ces observations suggèrent ainsi que la baisse de la sécrétion des VLDL hépatiques in vivo serait causée par des facteurs insulino-dépendants autre que le MTP afin de moduler l'assemblage de ces lipoprotéines (19).

3.3 Cytokines et endotoxine

Les cytokines sont des protéines qui, lors d'une infection ou d'une inflammation, induisent des modifications au niveau du métabolisme des lipides. La transcription de certaines protéines y jouant un rôle spécifique telles que la HMG-CoA réductase ou la 7α -hydroxylase par exemple, varie en fonction des changements d'ARNm. Dans le but d'étudier la régulation de la transcription du MTP par des facteurs d'inflammation, Navasa et collaborateurs ont traité des hamsters avec l'interleukine 1 (IL-1), l'interleukine 6 (IL-6), le tumor necrosis factor (TNF- α) ainsi qu'avec la lipopolysaccharide (LPS), une puissante endotoxine (84). Une diminution de l'ARNm du MTP s'en est suivie dans le foie suite à l'administration de la LPS, de l'IL-1 et du TNF- α . Par ailleurs, l'incubation de cellules HepG2 avec l'IL-1 et l'IL-6 produit également une baisse de l'ARNm. Cependant, la diminution de la masse protéique et de l'activité du MTP par les

cytokines et l'endotoxine, ne peut être observée que suite à de grandes périodes de traitement. Les auteurs de ces travaux suggèrent que certains facteurs de transcription, notamment le HNF-1 et l'AP-1, peuvent être responsables de ces modifications puisque leur expression et/ou leur activation est altérée durant la phase de réponse aiguë. Leur diminution pourrait limiter la transcription de certaines protéines hépatiques non requises dans le processus inflammatoire pour synthétiser celles qui sont nécessaires à la défense de l'organisme (84). En somme, même si l'effet des cytokines et de l'endotoxine réduit rapidement les niveaux d'ARNm, les changements constatés au niveau de la masse protéique et de l'activité du MTP sont mineurs et nécessitent un traitement prolongé. Il semble ainsi que la baisse des concentrations d'ARNm ne contribuent pas aux modifications du métabolisme des lipides remarquées durant la phase de réponse aiguë.

3.4 Éthanol

Le métabolisme des lipides est modifié par la consommation d'alcool. Parmi les anomalies associées à une ingestion excessive d'alcool, on trouve une élévation des taux plasmatiques du cholestérol, des triglycérides et des LDL, menant bien souvent à une augmentation du risque de développer des maladies cardiovasculaires. Lin et al. se sont intéressés à l'effet de l'éthanol sur la transcription du MTP (73). Les résultats démontrent in vitro (HepG2) et in vivo (rats) que l'éthanol diminue l'ARNm du MTP hépatique et intestinal, ainsi que la sécrétion de l'apo B. La baisse de stabilité de l'ARNm semble être l'un des mécanismes par lesquels l'éthanol affecte la transcription du gène du MTP. Il est également possible que l'éthanol module directement la transcription du gène. Cette hypothèse a été suggérée suite à la localisation d'un élément de répression à l'éthanol (ERE) au niveau du promoteur, mais elle n'est pas encore confirmée. Il n'en demeure pas moins que l'éthanol module la sécrétion des lipoprotéines riches en apo B en jouant sur la régulation de l'expression du MTP (73). Comment expliquer alors l'hypertriglycéridémie résultant d'une consommation faible ou

chronique d'alcool? Les multiples études pointent du doigt l'effet inhibiteur de l'alcool sur la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides (132).

L'ensemble des travaux effectués jusqu'à présent démontre que le MTP est modulé de manière modérée par différents effecteurs via des facteurs de transcription (figure 10). Certaines études ont mis en évidence les divergences de régulation dans le foie et l'intestin. La modulation du MTP dépend de la durée de l'exposition à divers effecteurs. Dans certains cas, l'expression du gène du MTP va de pair avec la formation des lipoprotéines. Cependant, on constate souvent que les changements ponctuels observés au niveau de la production des lipoprotéines sont indépendants de l'activité du MTP. L'expression génique semble plutôt être associée à un processus d'adaptation chronique (130).

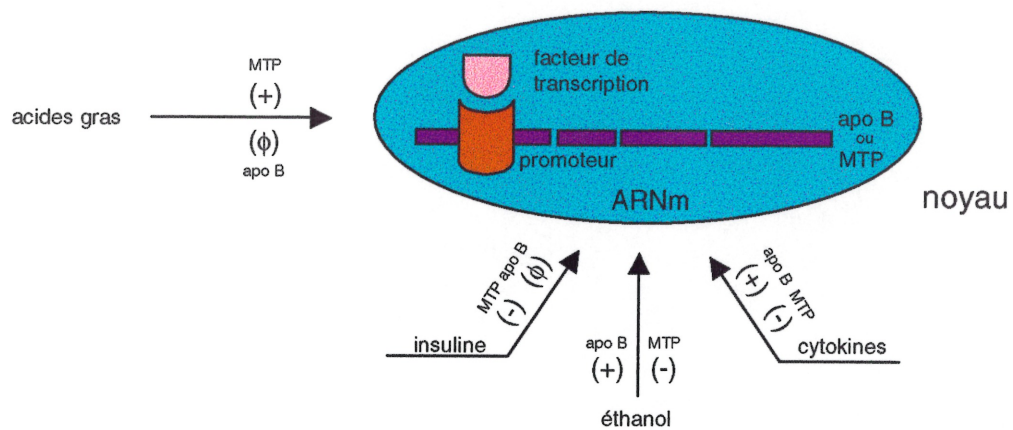


Figure 10. Régulation du MTP et de l'apo B. La régulation du MTP et de l'apo B est dictée par plusieurs effecteurs, notamment les acides gras, l'insuline, l'éthanol et les cytokines. Ils agissent principalement au niveau du noyau en modifiant, à la hausse ou à la baisse, la transcription du gène du MTP et de l'apo B via différents facteurs de transcription.

4. Objectifs de l'étude

Le MTP a suscité un grand intérêt depuis les 5 à 10 dernières années puisque, tel que mentionné précédemment, une déficience au niveau du gène de cette protéine est responsable d'une maladie autosomale récessive rare connue sous l'appellation d'abetalipoprotéinémie. À l'inverse, une suractivité du MTP pourrait occasionner une surproduction des lipoprotéines intestinales, contribuant ainsi à l'augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires. Considérant l'impact majeur associé aux conséquences de ces maladies, nous nous sommes intéressés à l'étude du MTP, plus particulièrement au niveau de sa distribution et de son expression dans les compartiments intracellulaires de l'entérocyte, de façon à pouvoir, éventuellement, établir une thérapie qui permettrait de traiter les patients atteints de ces désordres métaboliques.

En regard des informations connues à ce jour sur la structure et la fonction du Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP), il nous apparaissait pertinent de vérifier :

- 1) sa localisation au niveau des différents compartiments subcellulaires de l'entérocyte;
- 2) son association avec le PDI et l'apolipoprotéine B au niveau de l'appareil de Golgi;
- 3) son activité de transfert au niveau de l'appareil de Golgi;
- 4) son rôle dans le mouvement de l'apolipoprotéine B à travers les membranes du réticulum endoplasmique et celles de l'appareil de Golgi;

- 5) son expression au niveau des lipoprotéines pour examiner si le MTP est excrété hors de l'entérocyte ou si il reste accroché à la membrane basolatérale;
- 6) son expression et son activité de transfert au niveau de la bordure en brosse isolée à partir de différents modèles;
- 7) l'effet de deux inhibiteurs du cytosquelette (colchicine et nocodazole) sur son expression, de façon à étudier le trafic membranaire de la protéine du Golgi à la membrane apicale;

Chapitre 2: Articles

**LOCALIZATION OF MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN
IN THE GOLGI: POSSIBLE ROLE IN THE ASSEMBLY OF CHYLOMICRONS**

**Levy E, Stan S, Delvin E, Ménard D, Shoulders C, Garofalo C,
Slight I, Seidman E, Mayer G, Bendayan M.**

Departments of Nutrition, Biochemistry, Pediatrics,
Pathology and Cell Biology
Hôpital Sainte-Justine and University of Montreal
Montreal, Quebec, Canada

Running Title: Colocalization of active MTP and apo B in the Golgi apparatus

Corresponding Address: Dr. Emile Levy
GI-Nutrition
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montreal, Quebec H3T 1C5
Tel.: [REDACTED]
Fax: (514) 345-4999
E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

Although a critical role of microsomal transfer protein (MTP) has been recognized in the assembly of nascent apo B-containing lipoproteins, it remains unclear where and how it transfers lipids in the secretory pathway during the maturational process of apo B lipidation. The aims of this study were to determine whether MTP functions in the secretory pathway in addition to the endoplasmic reticulum (ER) and whether its large 97-kDa subunit interacts with the small 58-kDa protein disulfide isomerase (PDI) subunit and apolipoprotein (apo) B, particularly in the Golgi apparatus. Using a high resolution immunogold approach combined with specific polyclonal antibodies, the large and small subunits of MTP were observed over the rough ER and the Golgi. Double immunocytochemical detection unravelled the colocalization of MTP and PDI as well as MTP and apo B in these same subcellular compartments. To confirm the spatial contact of these proteins, Golgi fractions were isolated, homogenized, and incubated with an anti-MTP large subunit antibody. Immunoprecipitates were applied on SDS-PAGE and then transferred on to nitrocellulose. Immunoblotting the membrane with PDI and apo B antibodies confirmed the colocalization of these proteins with MTP. Furthermore, MTP activity assay disclosed apo B translocation and a substantial triglyceride transfer in the Golgi fractions. The occurrence of membrane-associated apo B in the Golgi, coupled with its interaction with active MTP, suggests an important role for the Golgi in the biogenesis of apo B-containing lipoproteins.

Supplementary Keywords: Enterocyte, intestinal epithelium, lipoproteins, intracellular transport, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus.

INTRODUCTION

Lipids constitute the most calorically dense dietary nutrients. They must undergo emulsification within the intestinal lumen, cell membrane permeation, intracellular esterification and incorporation into chylomicrons before reaching the circulation (for reviews, see Ref. 1-4). Despite significant progress, our understanding of the complex biosynthetic process involved in the formation and secretion of triglyceride-rich lipoprotein particles remains rather fragmentary. In particular, we know little about the sequential multistep assembly of apolipoproteins (apo) and lipids or the topology of the proteins in intracellular organelles implicated in lipoprotein production.

The study of naturally-occurring mutations and genetic variations in humans has greatly contributed to the identification of proteins essential to the synthetic pathway and to the delineation of key metabolic mechanisms (5-11). Inherited disorders of apo B and microsomal transfer protein (MTP) deficiency, have provided a unique source for delineating, at least partially, the role of these specific proteins as well as the elucidation of intracellular mechanisms resulting in lipid absorption and transport (5-11). The addition of core lipid to the nascent lipoprotein particle is thought to occur in conjunction with the translation and translocation of apo B in the ER (12-15). During this process, apo B remains tightly bound to the ER membrane, where it is folded. The initial complement of lipid is then added to form a nascent small, dense lipoprotein particle. In the second step, maturation of the particle occurs by the addition of the neutral lipid core (16-17). Based upon the known lipid-transfer activity of MTP, its localization in the lumen of the ER, and the observation that apo B is degraded intracellularly and not secreted in the absence of MTP, it has been proposed that MTP shuttles lipids from the ER membrane to the growing apo B chain in the ER, allowing the protein to translocate completely into the lumen (18-20). However, very little is

known about where and how the addition of bulk lipids to the nascent particle takes place.

Several models have been proposed for the formation of VLDL: (a) complete assembly of VLDL in the ER (21-23); (b) association of apo B with membranes until it reaches the Golgi apparatus, whereupon lipid is added to the particle (24-25); and (c) a sequential addition of lipid to apo B during its passage from the ER to the Golgi for secretion (26-28). If partial assembly takes place in the Golgi and additional core lipids and phospholipids are added in the pre-Golgi and Golgi as has been suggested (25, 29), one would anticipate the obligatory presence of MTP in these compartments.

Structurally, MTP is a heterodimer composed of a unique large subunit (97 kDa) and a smaller subunit (58 kDa) (30-33). The latter has been identified as the multifunctional enzyme protein disulfide isomerase (PDI). The role of PDI in the function of MTP is not entirely clear. The two subunits form a tight complex and their dissociation eliminates MTP activity. The intracellular location of MTP in the intestine has not been thoroughly elucidated. Subfractionation of crude liver homogenates suggested that MTP is located in hepatocellular microsomes (32, 33). Nevertheless, this finding was not confirmed by immunoelectron microscopy. In the present paper, the following issues are addressed: 1) Can MTP be found in secretory pathway sites other than the ER? 2) Does it occur alone or in close proximity to PDI in these compartments? 3) Does it colocalize with apo B? 4) If MTP can be detected in the Golgi apparatus, is it functional? 5) Can it facilitate apo B translocation from Golgi membranes? The answers to these questions provided by the experiments described herein help elucidate the mechanisms involved in the assembly and secretion of apo B-containing lipoproteins.

MATERIALS AND METHODS

Intestinal Specimens

Sprague Dawley rats were used for all experiments. Jejunal specimens were taken at the ligament of Treitz, washed and prepared for microscopy visualization. For the isolation of Golgi, the mucosa was scraped, homogenized and ultracentrifuged.

Tissue Preparation for Electron Microscopy

Intestinal specimens were fixed by immersion in 1% glutaraldehyde-0.1M phosphate-buffered (pH 7.4) for 2 h at 4°C and embedded in Lowicryl K4M at -20°C, according to our previously described procedures (34). Tissue blocks were examined by light microscopy to select well-oriented villus tips. Thin sections (60-80 nm) of the different tissue blocks were mounted on nickel grids with a carbon-coated Parlodion film and processed for immunocytochemistry.

Immunocytochemical Labeling

Protein A-gold immunocytochemical techniques were employed to detect the presence of MTP, PDI and apo B in rat intestinal tissue, as we described previously (34,35). Briefly, the tissue sections were initially washed in distilled water, incubated for 5 min on a drop of PBS containing 1% ovalbumin, and subsequently transferred to a drop of the PBS-diluted antibody (see below). After incubation (90 min) at room temperature, the grids were rinsed with PBS to remove unbound antibodies. They were transferred to the PBS ovalbumin (3 min) and incubated on a drop of protein A-gold (pH 7.2) for 30 min at room temperature. The tissue sections were then thoroughly washed with PBS, rinsed with distilled water and dried. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before examination with a Philips 410 electron microscope. Polyclonal antibodies were used at various dilutions (MTP 1/100, MTP large

subunit 1/50, PDI 1/10, apo B 1/100) in combination with protein A-gold complexes, which were prepared using 10-nm or 5-nm gold particles according to our established techniques (35,36). Control experiments were performed to assess the specificity of the results. Excess purified MTP was added to the antibody solution. Incubation with this solution was followed by the protein A-gold complex. Pre-immune rabbit serum (diluted 1:10) was used on tissue sections before incubation with protein A-gold complex. Incubations were also performed with the protein A-gold complex alone, omitting the antibody step in order to test for nonspecific adsorption of the protein A-gold complex to tissue sections (36).

Double-labeling Technique

In order to reveal the existence of MTP-PDI as well as MTP-Apo B complexes within the cellular compartments, double labeling techniques were applied. The tissue sections were simultaneously labeled for either MTP and PDI, or MTP and Apo B. The two-faced labeling technique (36,37) was applied in order to avoid any crossreaction between reagents. The small protein A gold complex (5 nm) was used for the first labeling protocol, while, the larger 10 nm protein A gold complex was used for the second. This protocol allows for the simultaneous visualization of two antigens (MTP and PDI or MTP and Apo B) in the same tissue section.

Antibodies

The antibodies for MTP, PDI and MTP large subunit were kindly provided by John Wetterau, Harris Jamil and one of the authors (Carol Shoulders). These antibodies have been characterized and utilized successfully in previous studies (7,31,38,39). The antibody directed against rat apo B was raised in rabbits (35). Confirmation of the specificity of the antibodies was obtained when purified MTP large and small subunits and apo B were fractionated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with each polyclonal antibody.

Microsomes and Golgi Fractions

Microsomal and Golgi fractions were prepared from enterocytes of fasted rats using modifications of reported techniques (40,41). Epithelial cells were homogenized (25%, w/v) in 0.25 M sucrose in buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 25 mM KCl) containing protease inhibitors (10 µg/ml leupeptin, 10 µg aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml antipain and 25 mM 4-aminophenyl-methanesulfonyl fluoride) using a polytron (Brinkmann Instruments) at a setting of 1 (30 sec). The homogenate from a group of animals was used to prepare microsomes (40). The homogenate from another group of animals was filtered through cheesecloth and then adjusted (150 parts homogenate and 95 parts 2M sucrose in the aforementioned buffer) to a final concentration of 1.07 M sucrose. The adjusted homogenate (19 ml/tube) was loaded into Beckman SW 28 tubes; 9 ml each of 0.9 and 0.2 M sucrose in the aforementioned buffer were then sequentially overlaid above the homogenate. The tubes were subsequently centrifuged in an SW 28 rotor for 2 h at 83,000 x g. Golgi fractions were collected at the 0.2/0.9 M sucrose interface.

To prepare Golgi membranes, Golgi fractions were mixed 1:1 (v/v) with the buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM KCl and the protease inhibitors as indicated above) with 20% glycerol and centrifuged for 90 min at 200,000 x g. Golgi membrane pellets were resuspended at one-twentieth of their original volume in 0.25M sucrose in the same buffer. Golgi membranes were solubilized with either 1% Igepal CA 630 (a Nonidet P-40 equivalent from Sigma) or 1% CHAPS and 0.2% Triton X-100-containing buffer. The extract was then centrifuged at 200,000 x g, and the pellet discarded. The purity of Golgi subcellular fraction was verified by assay of galactosyltransferase, a specific marker for Golgi organelles, and glucose-6-phosphatase, a marker for the ER.

Purification of Transfer Protein

The intestinal RE and Golgi specimens were sonicated in 1 ml of 10 mM phosphate buffer (pH 6.8) containing saponin (100 µg/ml) and protease inhibitors (leupeptin 10 µg/ml, Trasylol 10 µg/ml, pepstatin A 1 µg/ml). The MTP/PDI heterodimer was separated by ultracentrifugation (100,000 g) and concentrated using a Centricon 30 cartridge (5000 rpm x 30 min).

MTP Activity Assay

The triglyceride transfer assay was adapted from previous reports (30,39,42). The MTP transfer activity was determined by evaluating the transfer of radiolabeled triacylglycerol between two populations of unilamellar vesicles, as described (30,39,43). The donor and receiver vesicles were prepared by adding the appropriate amount of lipids to 500 µl of chloroform, followed by drying under a stream of nitrogen, rehydration and probe-sonication in 1.25 ml of 15:35 buffer (15 mM Tris/HCl, pH 7.4, 35 mM NaCl, 0.05% BSA, 3 mM sodium azide, 1 mM EDTA). Donor vesicles contained, per assay, 4 nmol of egg yolk phosphatidylcholine, 0.33 nmol of cardiolipin and 0.024 nmol of [³H]-trioleylglycerol (Amersham). Receptor vesicles contained 24 nmol of egg yolk phosphatidylcholine, 0.048 nmol of trioleylglycerol and ~4000 cpm [¹⁴C] dipalmitoyl phosphatidylcholine (Amersham). Both categories of vesicles comprised 0.01% butylated hydroxytoluene. Various amounts of semi-purified MTP were incubated with 5 µl donor and receptor vesicles in a final volume of 100 µl, for 1 h, at 37°C. The reaction was quenched by adding 400 µl of ice-cold 15:35 buffer (without BSA). The negatively charged donor vesicles were removed from the reaction mixture by adsorption onto DEAE-cellulose (Whatman DE-52). The supernatant (containing the receptor vesicles) was collected after a low-speed centrifugation (13000 g) and recentrifuged (13000 g) to assure a total removal of the DEAE-cellulose before scintillation counting. The ratio of [³H]-glycerol trioleate on [¹⁴C]-dipalmitoyl

phosphatidylcholine was determined and the percentage lipid transfer was calculated from the increase in this ratio.

In vitro Experiments with BMS-200150

Apo B synthesis was assessed in rat-everted intestine, as described previously (44). Then, 300 μCi of [^{35}S]-methionine was added to the RPMI-1640 medium for 1 h. The medium was removed, the intestine washed and again incubated for 2 h with medium containing 10 mM unlabeled methionine in the presence or absence of 15 μM BMS-200150, an inhibitor of MTP. Labeled apo B from membranes and the luminal contents of isolated microsome and Golgi fractions was immunoprecipitated, subjected to SDS-PAGE electrophoresis, excised from the gel and counted (45).

RESULTS

The first step in our studies was to test the specificity of the polyclonal antibodies that were generously provided by investigators who remarkably advanced the knowledge of MTP. By immunoprecipitating epithelial cell lysates, separating the immunoprecipitates on SDS-PAGE, and Western-blotting with large 97-kDa and small 58-kDa antibodies separately, we identified the expected 97-kDa and 58-kDa subunits corresponding to MTP and PDI components, respectively (Fig. 1). Immunoprecipitation of lysates and immunoblotting with polyclonal antibodies directed against the whole MTP complex resulted in the recovery of both MTP and PDI subunits (Fig. 1). Similar experimental procedures displayed the specificity of anti-apo B antibodies.

We subsequently used immunocytochemical techniques and isolated microsomal and Golgi fractions to reveal the presence of MTP in these subcellular compartments. The purity of microsomal and Golgi fractions was determined by the assay of galactosyltransferase, as a specific marker for Golgi membranes, and glucose-6-phosphatase as a marker for the ER. The results of marker protein assays from a typical fractionation are shown in Table 1. The Golgi fraction was enriched 96-fold with UDP-galactose galactosyltransferase specific activity over cell homogenate, whereas glucose-6-phosphatase activity was very low (1.26-fold) in this cell organelle. Furthermore, the rough ER-derived fraction was enriched 3.8-fold in the specific activity of glucose-6-phosphatase and 2.46-fold in that of galactosyltransferase.

Immunocytochemical Detection of MTP and PDI

An anti-MTP heterodimer antibody was initially applied to define the immunocytochemical pattern of labeling in enterocytes (Fig.1). The ultrastructural analysis of rat enterocytes revealed abundant labeling over the rough ER, the Golgi area and basolateral membranes (Fig. 2A). The trans-Golgi cisternae were more intensely labeled. Finally, the gold particles in the basal region of the enterocyte were

associated with the basolateral membrane and its interdigitations (Fig. 2B). Only very few particles were located over mitochondria.

Control experiments confirmed the specificity of these results. The preadsorption of the antibody with its antigen prior to performing immunocytochemical detection resulted in very low labeling in all cellular regions (Fig. 3). Similar data were obtained with the other control experiments, confirming the validity of the morphological findings.

The antibody used in this first series of experiments recognizes the whole 97-kDa-58-kDa MTP protein complex. We therefore attempted to distinguish between the two subunits by employing antibodies specific to the 97-kDa and to the 58-kDa polypeptides separately. With the antibody directed against the MTP large subunit, the distribution of the labeling (Fig. 4) over the rough ER and the Golgi apparatus was qualitatively identical to that recorded for the entire MTP complex, as illustrated in Figure 1. A similar distribution was observed when anti-PDI antibody was utilized (Fig. 5). Again, negligible labeling was noted with control experiments.

Double Immunocytochemical Detection of MTP & PDI as well as MTP & Apo B

The interaction of MTP with PDI is required for the production of the soluble, active MTP complex (33), which in turn is crucial for the assembly of apo B-containing lipoproteins (7, 8, 18, 19). In addition to demonstrating their labeling in the secretory pathway, as described above, we assessed their ultrastructural colocalization using double immunocytochemical detection. MTP was revealed by 10-nm protein A-gold, while PDI was shown using 5-nm protein A-gold (Fig. 6). Both particles were present over the rough ER and the Golgi area most of them in very close association. Only very few gold particles were detected over nuclei and mitochondria. These data provide evidence for the presence of MTP-PDI complexes not only in RER, but also in the Golgi apparatus.

Double immunocytochemical detection of the large subunit of MTP and apo B was also investigated in the rat jejunal enterocytes (Fig. 7). MTP and apo B were revealed by 10-nm and 5-nm protein A-gold complexes, respectively. Numerous doublets, formed by large and small gold particles, were found over the Golgi area, suggesting that MTP and apo B are colocalized and associated in the same cellular compartments of the enterocyte. It must be noted that only a certain percentage of the gold particles revealing a large MTP subunit or PDI appear colocalized. This may be due to numerous factors, such as the ubiquitous nature of PDI, which fulfills various functions in other locations intrinsic to the ER, and technical limitations stemming from immunogold itself.

Interaction of MTP Large Subunit with PDI and Apo B in the Golgi

The aforementioned ultrastructural studies demonstrated the presence of MTP complex and the colocalization of its two subunits in the Golgi apparatus. Additional studies were carried out to assess its function in this subcellular compartment. Since the association of PDI (58-kDa) with MTP large subunit (97 kDa) is necessary to maintain the catalytically active form of the triacylglycerol transfer protein and to prevent the aggregation of the 97-kDa component, we examined their physical interaction. For this purpose, Golgi fractions were isolated and homogenized in a nondenaturing buffer. Immunoprecipitation was also carried out with an anti-MTP large subunit antibody under nondenaturing conditions. The immunoprecipitates were run onto SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblotting the membrane with anti-PDI antibody confirmed the presence of PDI (Fig. 8A). Thus, anti-MTP large subunit appeared to precipitate PDI, while MTP antibodies recognized MTP large subunit (Fig. 8B), indicating an interaction between the MTP large subunit and PDI in the Golgi. In a second step, MTP activity was measured. The assay disclosed substantial triacylglycerol transfer activity in the Golgi fraction compared to that of microsomes (Fig. 9). Together these findings indicate that the MTP complex is present

in the Golgi and that it maintains its capacity to transfer triacylglycerol in that organelle. Finally, based on the protein recovery of isolated organelles, intestinal microsomes and Golgi fractions represented 64% and 46%, respectively, of total cellular MTP activity.

In order to confirm the spatial contact of MTP with apo B in the Golgi fractions, immunoblotting experiments were performed. Immunoprecipitation was carried out with the antibody directed against the large MTP subunit. The immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and transferred onto a MTP nitrocellulose membrane. The latter was blotted with anti-apo B antibodies. As shown in Figure 8C, no apo B was visualized with nonimmune sera, whereas it was clearly detected with anti-apo B antibody. These observations are consistent with the aforementioned ultrastructural findings illustrating the colocalization of MTP with apo B.

Finally, Golgi fractions were exposed to non-immune serum or anti-apo B antibodies. The immunoprecipitate was run on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blotted with MTP large subunit antibody. MTP large subunit (97 kDa) was detected in the anti-apo B immunoprecipitate, but not in the non-immune precipitate (Fig. 10).

Presence of Apo B in the Golgi Membrane

The presence of apo B in the Golgi may be derived from apo B-containing lipoprotein transit from the RER or from its close association with the Golgi membrane. In order to demonstrate that apo B is a resident membrane protein of the Golgi apparatus, membranes were isolated, immunoprecipitated with anti-apo B antiserum, applied on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Again, we used galactosyltransferase as a marker of Golgi membranes and the overall enrichment of its specific activity was 133-fold. Anti-apo B antibodies revealed the presence of apo B, suggesting that apo B is associated with Golgi membranes (Fig. 11).

Elimination of any Possibility of MTP Leakage from the ER to the Golgi

Immunocytochemical labeling has demonstrated the presence of MTP, not only in the ER, but also in the Golgi apparatus. In order to demonstrate that the finding of MTP in the Golgi is not merely the result of leakage from the ER, two approaches were adopted. First, a quantitative estimation was achieved in order to compare protein enrichment in the Golgi and ER. To this end, about 50 fields from the Golgi-ER area were examined at X16,500 magnification and MTP labeling densities in each cellular compartment were evaluated by morphometrical methods (36). The calculated mean ratio value between the Golgi and ER was found to be 2.72, showing MTP enrichment in the Golgi apparatus and the concentration process taking place in this organelle. Second, an ER-resident protein, namely the Grp78(Bip), was revealed by immunocytochemistry. Specific labeling was obtained over the rough ER of the enterocytes, whereas only a very few gold particles were detected at the level of the Golgi apparatus (Results not shown), confirmed by the calculated mean ratio value (0.33) between the Golgi and ER labelings. Altogether, these data indicate that leakage from the ER to the Golgi is negligible.

Role of MTP in Apo B Movement

In further experiments, we investigated the effects of MTP inactivation by BMS-200150 on the behavior pattern of newly synthesized apo B in the membranes and luminal contents of both microsomal and Golgi fractions. Apo B disappeared more rapidly from microsomal and Golgi membranes after a 2-h chase period than a 1-h pulse. However, with the inactivation of MTP, a delay was noted in the removal of newly synthesized apo B from microsomal and Golgi membranes. In addition, little effect of the MTP inhibitor was observed on the disappearance of apo B from the lumen of the two subcellular compartments. These experiments suggest that MTP protects apo B against co-translational degradation.

DISCUSSION

Most of the studies undertaken to delineate the role of MTP in the assembly of apo B-containing lipoproteins have suggested that the ER represents its site of action, in view of its involvement in the biogenesis of triglyceride-rich lipoproteins. It was previously unknown whether MTP is found in other subcellular organelles in the small gut. The present investigation examined the intracellular distribution of the large subunit of MTP along with PDI and apo B in the rat small intestine. Our data revealed that, at the electron microscope level, MTP is present particularly in the RER and the Golgi apparatus of the absorptive epithelial cells. Double immunocytochemical labeling demonstrated the co-localization of the MTP large subunit with PDI and apo B. The biochemical analyses not only confirmed the ultrastructural studies, but also demonstrated the association between the MTP large subunit and PDI in the Golgi, the preservation of its transfer activity, and its interaction with apo B. These observations suggest that this organelle likely represents a site active in triglyceride-rich lipoprotein assembly.

PDI and the MTP large subunit are not covalently linked in the heterodimer, but they form a highly stable protein complex (31). The spatial contact of the large subunit with PDI is necessary to maintain the transfer protein in a nonaggregated and catalytically active form (30-33). Data in the present study documented the presence of the 58-kDa and 97-kDa subunits of MTP in basolateral membranes. Even if our ultrastructural experiments showed that the two subunits seem in close physical proximity we are not able to indicate at this point whether basolateral membranes contain active MTP. Another puzzling question is whether MTP accompanies lipoproteins to this subcellular area. Experiments from our laboratory have shown that freshly isolated lipoproteins from the blood circulation are devoid of MTP (results not shown), suggesting that the latter does not exit the cell. Currently, it is not clear whether MTP/PDI complex plays not only a key role in triglyceride-rich lipoprotein

assembly but also a chaperone function, which facilitates the secretion of chylomicrons and VLDL.

Much of our knowledge concerning apo B synthesis and lipoprotein assembly stems from studies using hepatocytes, including human and rat hepatoma cells, McA-RH7777 cells and primary hepatocytes (13,18-20,46). These hepatic models generally produce both apo B-48 and apo B-100. The lipidation of apo B is thought to be carried out in two phases (16,17). Initially, the stabilization of apo B necessitates an association with a small quantity of neutral lipids, which protects it from misfolding and degradation. The second step is characterized by the bulk transfer of triacylglycerol to the secretion-competent form of apo B, resulting in the production of mature particles of VLDL. MTP has been shown to transport lipid from the ER membrane to apo B in the lumen of the ER (7,8,19,39,45). This process may be promoted by a physical interaction between MTP and apo B (46). Our results show that MTP is located in the Golgi apparatus of rat intestine in its active form and that it interacts with apo B locally, as was demonstrated in the ER by Wu *et al.* (46) and Patel and Grundy (47).

The requirement of lipid transfer activity in the assembly of apo B-containing lipoproteins has been underscored by genetic disorders and various molecular studies. Evidence has been presented for protein-protein interactions between apo B and MTP, which may be crucial for the transfer of lipids to apo B during its translocation or may indicate a chaperone-like activity for MTP in apo B folding, assembly and secretion. The binding sites involved in these interactions have recently been proposed (49,50). On the other hand, PDI has been shown to be associated with MTP in order to maintain the MTP complex in a soluble state (30-33). Since PDI contains the "KDEL" ER-retention sequence, it might anchor the MTP complex in the ER, at the site of apo B translocation (51). Additional studies are required to determine whether most of these events occur in the Golgi apparatus.

The occurrence of membrane-associated apo B in the Golgi, coupled with its interaction with active MTP, suggests an important role for the Golgi in the assembly of apo B-containing lipoproteins. Although direct evidence for such a hypothesis is lacking, earlier reports proposed a pivotal role for the Golgi in the formation of triglyceride-rich lipoproteins. Bamberger and Lane reported that approximately 50% of apo B is membrane-associated in both the ER and the Golgi (24,25). Using pulse-chase experiments, they concluded that the assembly of triacylglycerol with apolipoproteins occurs in the Golgi. Similarly, Higgins suggested that the *trans*-Golgi region is the major intracellular site for the assembly of apo B with triacylglycerol and phospholipid (52). Furthermore, Olofsson *et al.* emphasized that a substantial portion of the oligosaccharide chains of apo B, along with various posttranslational modifications of both lipid and apolipoprotein moieties, is processed in the Golgi (53). Accordingly, our data showed that MTP inactivation by BMS-200150 delayed the net removal of newly synthesized apo B from the microsomal and Golgi membranes but not from the corresponding luminal compartments. Similar findings were reported in the liver by Hebbachi *et al.* (54,55). It seems, therefore, that the association of apo B with lipid components requires active MTP in both the microsomal and Golgi membranes in order to allow the secretion-competent form of apo B to form chylomicrons in the enterocyte. Taken together, these observations point to the Golgi's important role in the assembly of apo B-containing lipoproteins, as suggested by our results herein.

How do our ultrastructural findings and biochemical data fit the two-phase process for apo B core lipidation? It is possible that nascent apo B-48 HDL particles, originating in the ER, are supplied with neutral lipid droplets at the junction of the rough and smooth ER, as proposed by many investigators (for review, see 4). However, we cannot exclude the possibility that lipid loading is completed in the Golgi compartment. During the continuous maturation process, MTP may shuttle lipids from the Golgi membrane or from locally available lipid droplets to the growing apo B-containing lipoprotein particles. As noted above, a considerable body of literature

supports a key role of the Golgi in triglyceride-rich lipoprotein assembly and phospholipid acquisition (52,53). On the other hand, we observed the lipid transfer protein activity of MTP in the Golgi as well as its localization to the lumen of Golgi and its association with apo B at this site. One may thus suggest that the Golgi apparatus represents an additional site where MTP enables nascent apo B to attain a secretable conformation by providing sufficient triacylglycerol for the formation of a neutral lipid core. The process may be promoted by a physical interaction between MTP and apo B. This hypothesis is consistent with the recent observations relative to: (a) the heavy labeling of Golgi membrane for apo B following radioactivity pulses (54,55); (b) Golgi-mediated degradation of apo B (56-58); and (c) the delay of apo B removal from the Golgi membrane following MTP inhibition with BMS-200150 (55). In our studies, the possibility of substantial contamination of Golgi membranes with microsomes was ruled out by dequantification of marker enzymes. Moreover, potential MTP leakage from the ER to the Golgi apparatus was rejected by appropriate immunocytochemical studies. Thus, the Golgi may represent an additional important site for lipoprotein assembly.

In summary, the present investigation demonstrates the presence of MTP in subcellular compartments associated with the secretory pathway other than the ER. Furthermore, the colocalization of functional MTP and the membrane-associated apo B in the Golgi fraction strongly suggests a role of the Golgi apparatus in the assembly or maturation of intestinal TG-rich lipoproteins.

ACKNOWLEDGMENT

This was supported by research grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10583) and the Canadian Heart Association, as well as Research Scholarship Awards from the FRSQ (EL, ES). The authors thank Drs. JR Wetterau and H Jamil for the polyclonal antibodies. We also acknowledge the expert secretarial assistance of Danielle St-Cyr Huot.

LEGENDS

Figure 1: Antibody Specificity. Cellular lysates were separately reacted with the antibodies directed against MTP, PDI and apo B. The immunoprecipitates were subjected to gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Thereafter, the latter were blotted with large 97-kDa MTP subunit antibodies, small 58-kDa MTP subunit (PDI) antibodies or apo B antibodies. Molecular weight standards (ST) were used to identify the location of the proteins.

Figure 2: Immunocytochemical detection of MTP in rat enterocytes. Protein A-gold immunocytochemical technique was applied with the polyclonal antibody directed against heterodimer MTP/PDI in order to localize it in absorptive cells of rat jejunum. The labelling by gold particles revealed the antigenic sites of MTP/PDI heterodimer at the level of the ER, Golgi apparatus (G) and the basolateral membrane (blm). Mitochondria (M) are devoid of labeling. X 40,000.

Figure 3: Assessment of labeling specificity. The tissue section was incubated with antigen-adsorbed-antibody against the MTP large subunit followed by the protein A-gold complex. The labeling by gold particles was drastically reduced, very few particles being present over the different cellular compartments. G, Golgi apparatus; RER, rough endoplasmic reticulum; m, mitochondria. X30,000.

Figure 4: Immunocytochemical detection of the MTP large subunit in rat jejunal enterocytes. Specific polyclonal antibody directed against the 97-kDa large subunit of MTP was employed in combination with Protein A-gold. Labeling is present over the rough ER and the Golgi area (G), including small vesicles (v). Mitochondria (M) are devoid of labeling. X 30,000.

Figure 5: Immunocytochemical detection of PDI in rat jejunal enterocytes. Protein A-gold was used in combination with a specific polyclonal antibody directed against the small 57-kDa PDI subunit of MTP. Labeling is present over the rough ER (RER), the Golgi apparatus (G) and the basolateral membrane (blm). x 30,000

Figure 6: Double immunocytochemical detection of MTP large subunit and PDI using corresponding specific antibodies and protein A-gold complexes of different sizes. MTP large subunit is revealed by 10-nm protein A-gold, while PDI is visualized by 5-nm protein A-gold. Labeling for both antigens is present in the rough endoplasmic reticulum (RER), Golgi (G) and basolateral membrane (blm). The association of both antigens is revealed by the formation of large and small gold particle doublets (some have been circled). Mitochondria (m) and nuclei (N) are devoid of labeling. A x 50,000; B x 30,000.

Figure 7: Double immunocytochemical detection of MTP large subunit and apo B using the corresponding specific antibodies and the protein A-gold complexes formed by large and small gold particles. MTP large subunit is revealed by 10-nm protein A-gold, whereas apo B is detected by 5-nm protein A-gold complex. Labeling for both antigens is present over the Golgi apparatus (G). The association of both antigens is revealed by the formation of large and small gold particle doublets (some of which are circled). x 45,000.

Figure 8: Association of MTP large subunit with apo B and PDI in the Golgi. Golgi were disrupted with a nondenaturing buffer and immunoprecipitated with nonimmune serum or anti-MTP large subunit antibody [α -MTP(1s)]. The immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blotted with either anti-

PDI antibody (panel A), anti-MTP large subunit antibody (panel B) or anti-apo B antibody (panel C). In panel A, immunoblotting with anti-PDI antibody demonstrated that PDI co-precipitates by using anti-MTP large subunit antibody. In panel B, immunoblotting with anti-MTP large subunit antibody demonstrated that MTP large subunit was immunoprecipitated by using anti-MTP large subunit. In panel C, immunoblotting with anti-apo B antibody revealed that apo B co-immunoprecipitated with the large subunit of MTP.

Figure 9: MTP activity in the Golgi fraction isolated from the enterocytes of rat jejunum. Microsomal and Golgi fractions were prepared as described in Methods. MTP was quantified by measuring the rate of transfer of ^3H -labeled triglyceride from donor vesicles to acceptor vesicles prepared as reported in the Methods section.

Figure 10: Precipitation of MTP large subunit with apo B antibodies. Golgi homogenate was immunoprecipitated with either nonimmune serum or anti-apo B antiserum (a-apo B). The immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blotted with anti-MTP large subunit [MTP (Is)].

Figure 11: Apo B location in Golgi membranes. Golgi membranes were prepared and incubated with non immune serum (1) or anti-apo B antiserum (2,3,4). The immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blotted with anti- Apo B antiserum.

REFERENCES

1. Davidson, N.O. (1994) *Physiology of Gastrointestinal Tract*. Johnson, L.R., editor. Third edition. Raven Press, New York. 1909-1934
2. Tso, P. (1994) *Physiology of Gastrointestinal Tract*. Johnson, L.R., editor. Third edition. Raven Press, New York. 1867-1907
3. Levy, E. (1992) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **70**, 413-419
4. Hussain, M.M., Kancha, R.K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H., and Bakillah, A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1300**, 151-170
5. Levy, E. (1996) *Clin. Invest. Med.* **19**, 317-324
6. Levy, E., Marcel, R., Milne, R.W., Grey, V.L., and C. Roy. (1987) *Gastroenterology* **93**, 1119-1126
7. Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Bouma, M.E., Eisenberg, C., Munck, A., Hermier, M., Schmitz, J., Gay, G., Rader, D.J., and Gregg, R.E. (1992) *Science* **258**, 999-1001
8. Shoulders, C.C., Brett, D.J., Bayliss, J.D., Narcisi, T.M., Jarmuz, A., Grantham, T.T., Leoni, P.R., Bhattacharya, S., Pease, R.J., Collen, P.M., et al. (1993) *Hum. Mol. Genet.* **2**, 2109-2116
9. Black, D.D., Hay, R.V., Rohwer-Nutter, P.L., Ellinas, H., Stephens, J.K Sherman, H., Teng, B.B., Whittington, P.F., and Davidson, N.O. (1991) *Gastroenterology* **101**, 520-528
10. Young, S.G., Krul, E.S., McCormick, S., Farese, R.V. Jr, and Linton, M.F. (1996) *Methods Enzymol.* **263**, 120-145

11. Wu, J., Kim, J., Li, Q., Kwok, P.-Y., Cole, T.G., Cefalu, B., Averna, M., and Schonfeld, G. (1999) *J. Lipid Res.* **40**, 955-959
12. Boren, J., Graham, L., Wettsten, M., Scott, J., White, A., and Olofsson, S.-O. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9858-9867
13. Rustaeus, S., Lindberg, K., Boren, J., and Olofsson, S.-O. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 28879-28886
14. Spring, D.J., Chem-Liu, L.W., Chatterton, J.E., Elovson, J., and Schumaker, V.N. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 14839-14845
15. McLeod, R.S., Zhao, Y., Selby, S.L., Westerlund, J., and Yao, Z. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2852-2862
16. Swift, L.L. (1995) *J. Lipid Res.* **36**, 395-406
17. Boren, J., Rustaeus S., and Olofsson, S.-O. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 25879-25888
18. Gordon, D.A., Jamil, H., Gregg, R.E., Olofsson, S.-O., and Boren, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 33047-33053
19. Wang, Y., McLeod, R.S., and Yao, Z. (1997) *J. Biol. Chem.* **262**, 12272-12278
20. Benoist, F., and Grand-Perret, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20435-20442
21. Alexander, C.A., Hamilton, R.L., and Havel, R.J. (1976) *J. Cell. Biol.* **69**, 241-263
22. Borchardt, R.A., and Davis, R.A. (1987) *Biol. Chem.* **262**, 16394-16402
23. Rusinol, A., Verkade, H., and Vance, J.E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 3555-3562
24. Bamberger, M.J., and Lane, M.D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11868-11878

25. Bamberger, M.J., and Lane, M.D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2390-2394
26. Bostrom, K., Boren, J., Wettesten, M., Sjoberg, A., Bondjers, G., Wiklund, O., Carlsson, P., and Olofsson, S.O. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4434-4442
27. Bostrom, K., Wettesten, M., Boren, J., Bondjers, G., Wiklund, O., and Olofsson, S.O. (1987) *J. Biol. Chem.* **261**, 13800-13806
28. Janero, D.R., and Lane, M.D. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14496-14504
29. Hamilton, R.L., Moorehouse, A., and Havel, R.J. (1991) *J. Lipid Res.* **32**, 529-543
30. Wetterau, J.R., and Zilversmit, D.B. (1985) *Chem. Phys. Lipids* **38**, 205-222
31. Wetterau, J.R., Combs, K.A., Spinner, S.N., and Joiner, B.J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 9800-9807
32. Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Laplaud, P.M., and McLean, L.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 4406-4412
33. Wetterau, J.R., Combs, K.A., McLean, L.R., Spinner, S.N., and Aggerbeck, L.P. (1991) *Biochemistry* **30**, 9728-9735
34. Bendayan, M. (1984) *J. Electron. Microsc. Tech.* **1**, 243-270
35. Levy, E., Rochette, C., Londono, I., Roy, C.C., Milne, R.W., Marcel, Y.L., and Bendayan, M. (1990) *J. Lipid Res.* **31**, 1937-1946
36. Bendayan, M. (1995) *Prog. Histochem. Cytochem.* **29**, 1-163
37. Bendayan, M. (1982) *J. Histochem. Cytochem.* **30**, 81-85

38. Gordon, D.A., Jamil, H., Sharp, D., Mullaney, D., Yao, Z., Gregg, R., and Wetterau, J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7628-7632
39. Leiper, J.M., Mayliss, J.D., Perse, R.J., Brett, D.J., Scott, J., and Shoulders, C.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21951-21954
40. Levy, E., Garofalo, C., Rouleau, T., Gavino, V., and Bendayan, M. (1996) *Hepatology* **23**, 848-857
41. Marks, D.L., Wu, K., Paul, P., Kamisaka, Y., Watanabe, R., and Pagano, R.E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 451-456
42. Narcisi, T.M., Shoulders, C.C., Chester, S.A., Read, J., Brett, D.J., Harrison, G.B., Grantham, T.T., Fox, M.F., Povey, S., de Bruin, T.W., Ekerlens, D.W., Muller, D.P.R., Lloyd, J.K., and Scott, J. (1995) *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 1298-1310
43. Wetterau, J.R., Lin, M.C.M., and Jamil, H. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1345**, 136-150
44. Levy, E., Garofalo, C., Thibault, L., Dionne, S., Daoust, L., Lepage, G., Roy, C.C. (1992) *Am.J.Physiol.* 262:G319-G326, 1992
45. Levy, E., Sinnett, D., Thibault, L., Nguyen, T.D., Delvin, E., Ménard, D. (1996) *FEBS Lett.* 393:253-258
46. Gibbons, G.F. (1994) *Curr. Opin. Lipidol.* **5**, 191-199
47. Patel, S.B., and Grundy, S.M. (1996) *J. Biol. Chem.* **272**, 18686-18694
48. Wu, X., Zhou, M., Huang, L.-S., Wetterau, J., and Ginsberg, H.N. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10277-10281

49. Hussain, M.M., Bakillah, A., Nayak, N., and Shelness, G.S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 25612-25615
50. Mann, C.J., Anderson, T.A., Read, J., Chester, .S.A., Harrison, G.B., Köchl, S., Ritchie, P.J. , Bradbury, P., Hussain, F.S., Amey, J., Vanloo, B., Rosseneu, M., Infante, R., Hancock, J.M., Levitt, D.G., Banaszak, L.J., Scott, J., and Shoulders, C.C. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**, 391-408
51. Munro, S., and Pelham, H.R. (1987) *Cell* **48**, 899-907
52. Higgins, J.A. (1988) *FEBS Lett.* **232**, 405-408
53. Olofsson, S.O., Bjursell, G., Bostron, K., Carlsson, P., Elovson, J., Protter, A.A., Reuben, M.A., and Bondjers, G. (1987) *Atherosclerosis* **68**, 1-17
54. Hebbacchi, A.-M., and Gibbons, G.F. (1999) *Biochem. Biophys. Acta* **1441**, 36-50
55. Hebbachi, A.-M., Brown, A.-M., and Gibbons, G.F. (1999) *J. Lipid Res.* **40**, 1758-1768
56. Verkade, H.J., Fast, D.G., Russinol, A.E., Scraba, D.G., and Vance, D.E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24980-24996
57. Wang, C.-N., Hobman, T.C., and Brindley, D.N. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24924-24931
58. Fast, D.G., and Vance, D.E. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1258**, 159-168
59. Bruneau, N., Lombardo, G., Levy, E., Bendayan, M. (2000) *Microsc. Res. Tech.* **49**:329-345

60. Little, E., Ramakrishnan, M., Roy, B., Gazit, G., Lee, A.S. (1994) Crit Rev Eukar Gene Expr 4:1-19

Table 1: Specific activities of marker enzymes of subcellular fractions

Organelle	Galactosyltransferase	Glucose-6-phosphatase
	nmol/mg protein/min	
Whole homogenate	0.041 (x1.00)	0.720 (x1.00)
Microsomal fraction	0.101 (x2.46)	2.735 (x3.80)
Golgi fraction	3.926 (x95.75)	0.907 (x1.26)

Microsomal and Golgi subcellular fractions were prepared as described in Methods. The purity of the organelle fractions was assessed by determining the specific activities of UDP-galactose galactosyltransferase and glucose-6-phosphatase. The enrichment of the marker enzymes in each cellular fraction was calculated by dividing the specific activity of the subcellular fraction by that of the homogenate (data are given in parentheses). The data represent the average of n=2.

Table 2: Effect of MTP inhibitor on apo B from the microsomal and Golgi membranes and lumen

Time (h)	Microsomes		Golgi	
	membranes (dpm/mg protein)	lumen	membranes (dpm/mg protein)	lumen
0	1688	1002	2480	479
2 (-BMS)	631	494	1038	234
2 (+BMS)	1070	519	2351	288

Intestinal everted sacs were pulse-labeled with [³⁵S]-methionine for 1h and chased for 2h either in the presence or absence of BMS-200150. The subcellular organelles (microsomes and Golgi) were prepared, and labeled apo B was determined in isolated membranes and luminal contents. Results are the mean of two experiments.

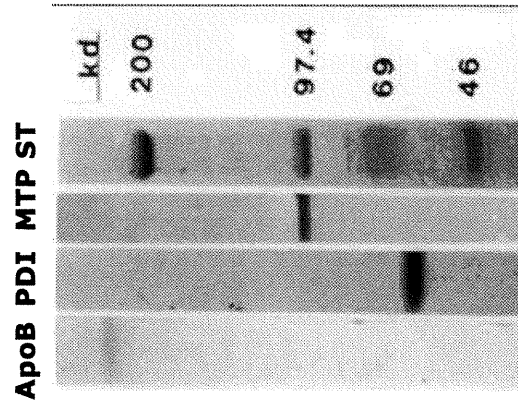


Figure 1

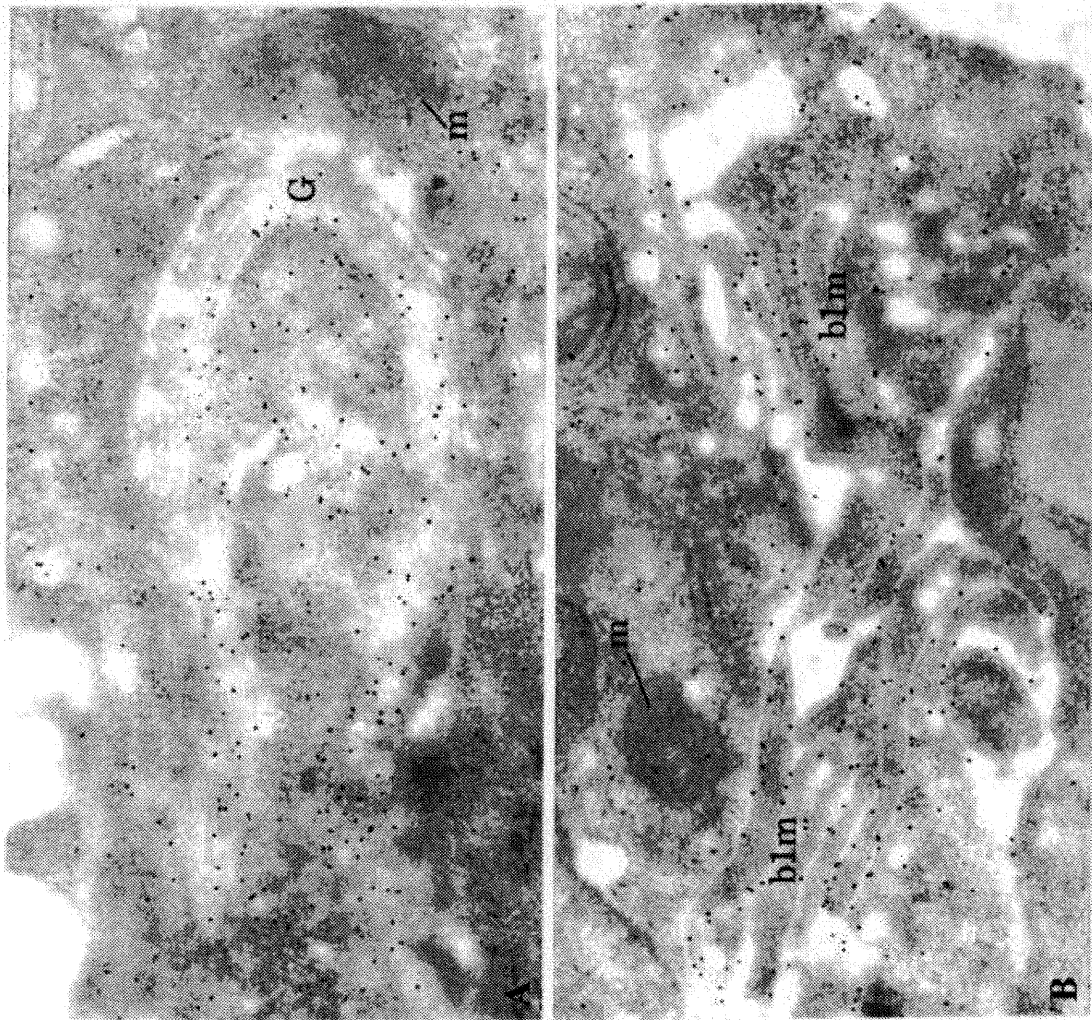
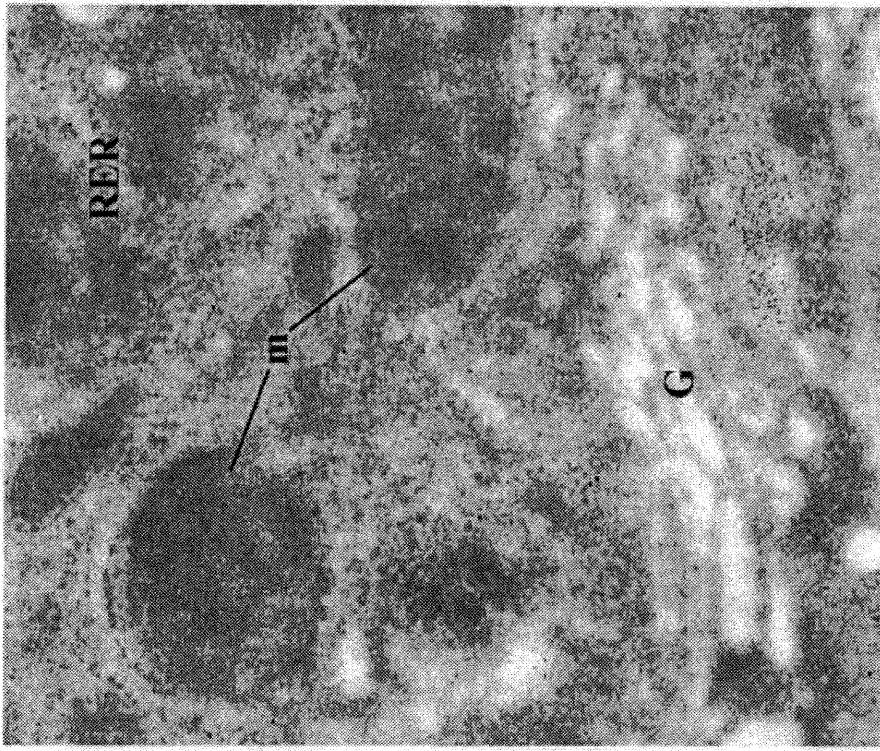


Figure 2

Figure 3



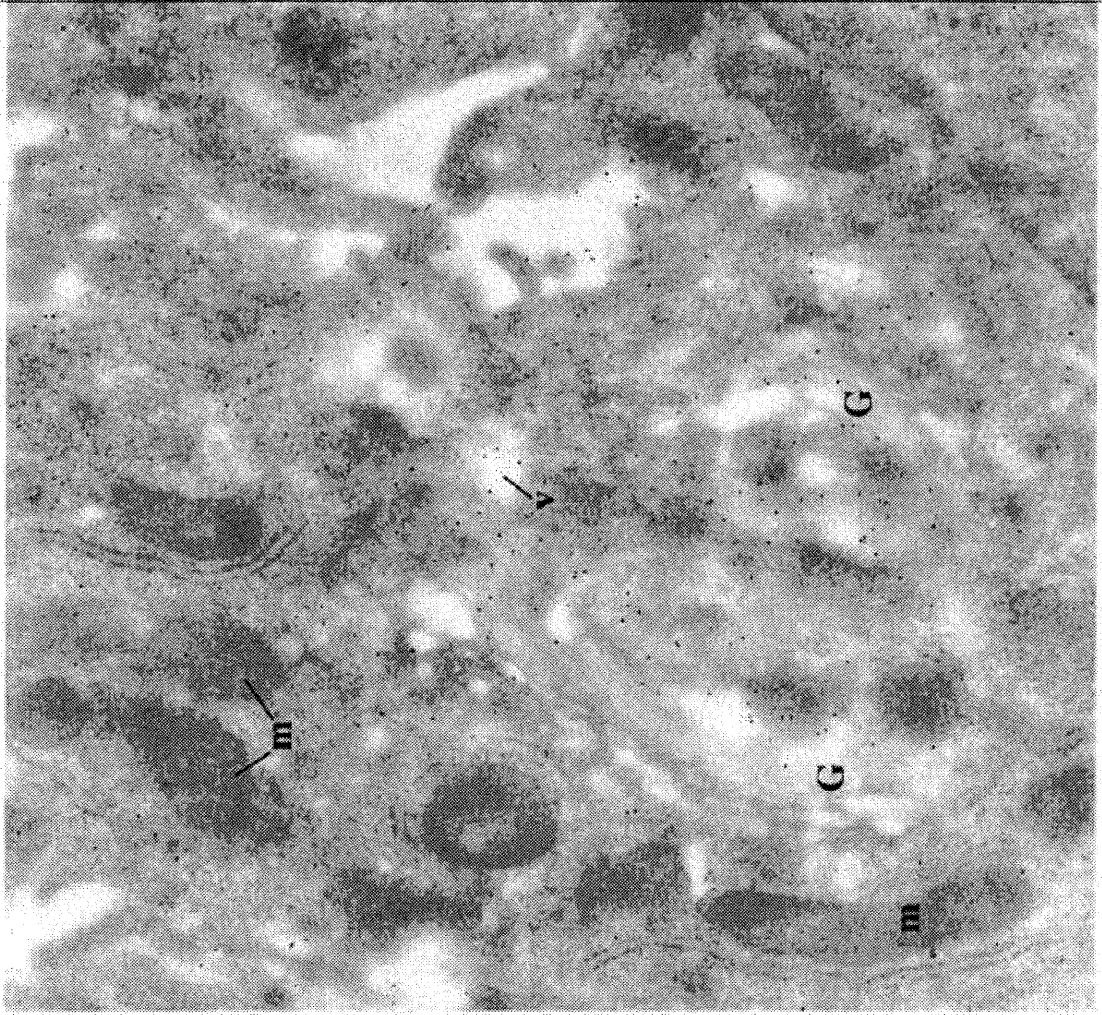


Figure 4

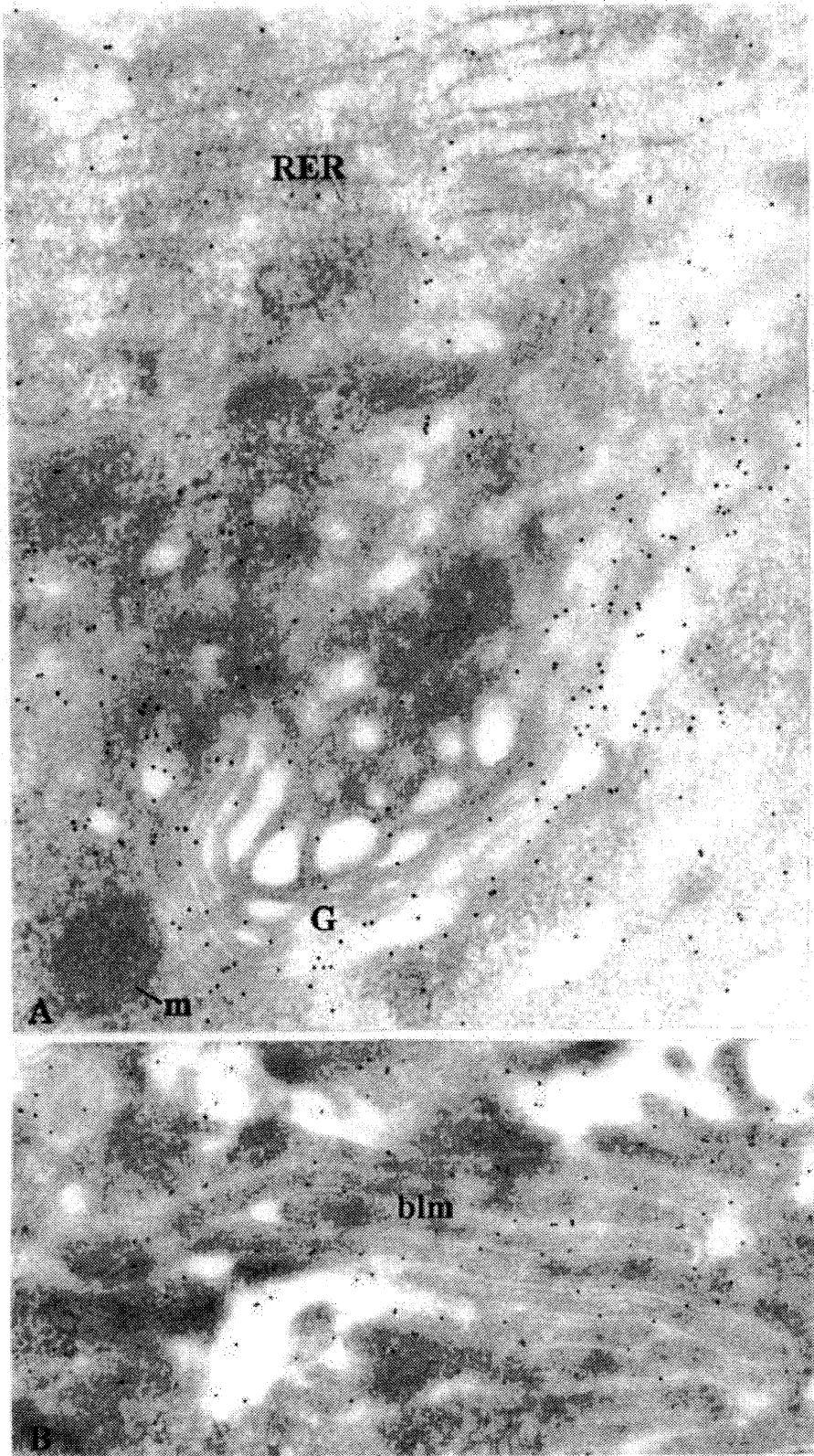


Figure 5

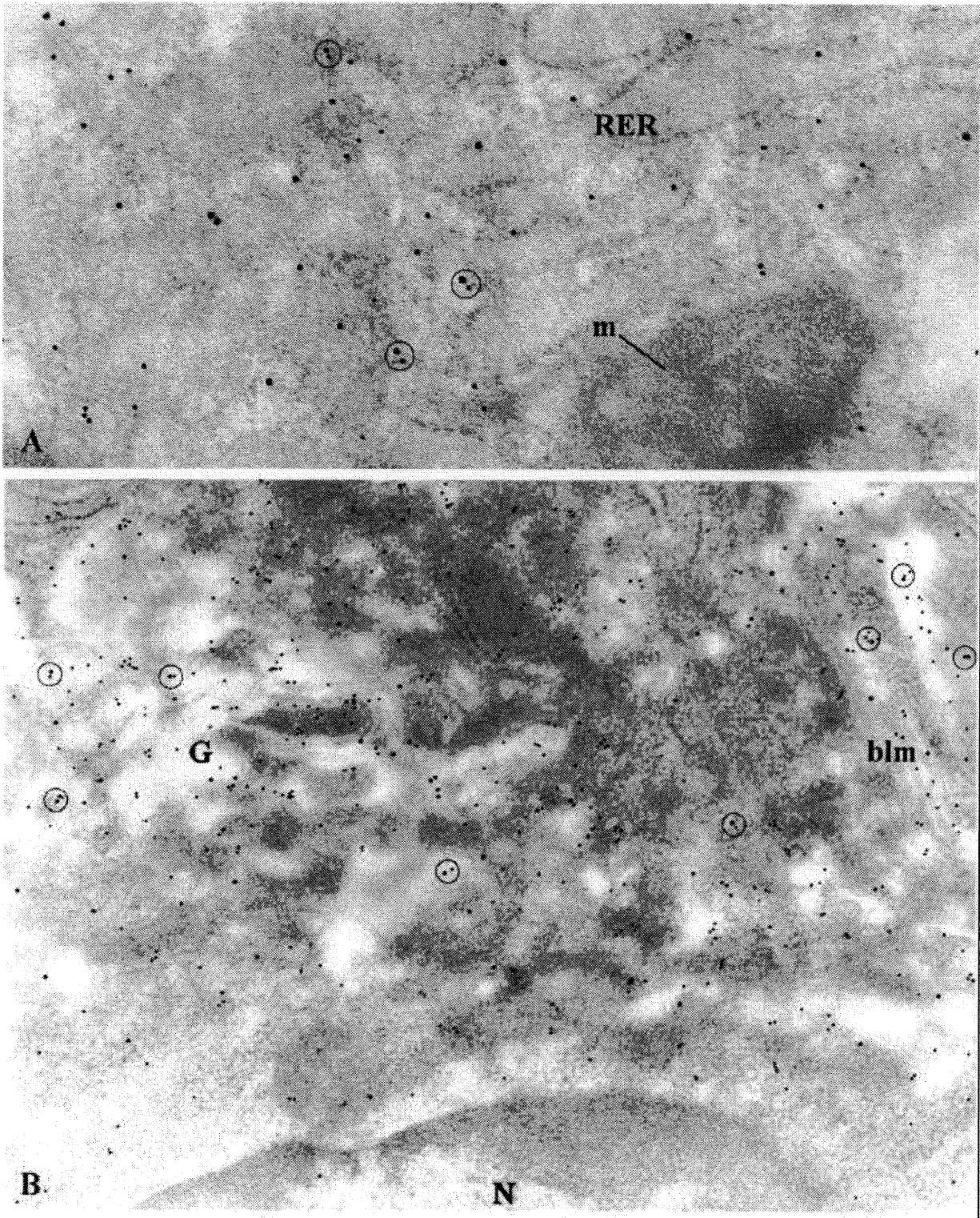


Figure 6

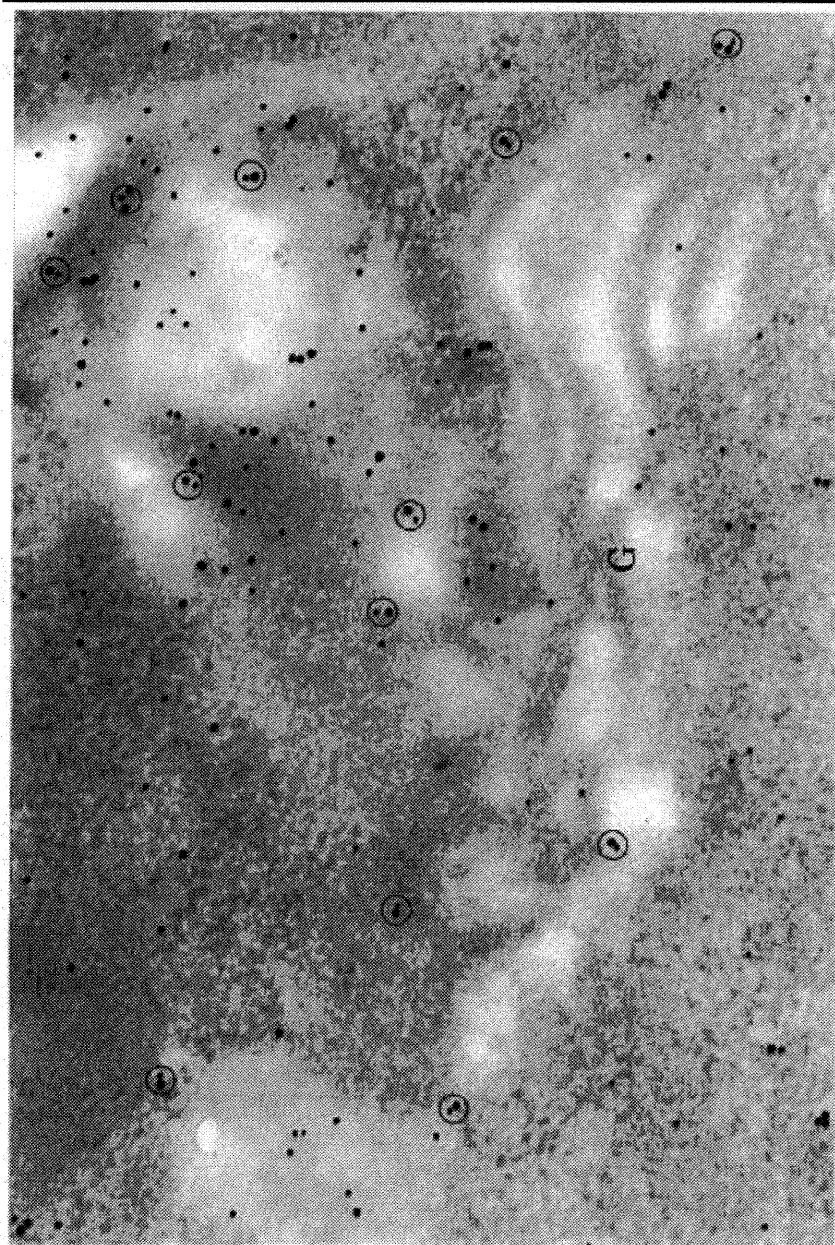


Figure 7

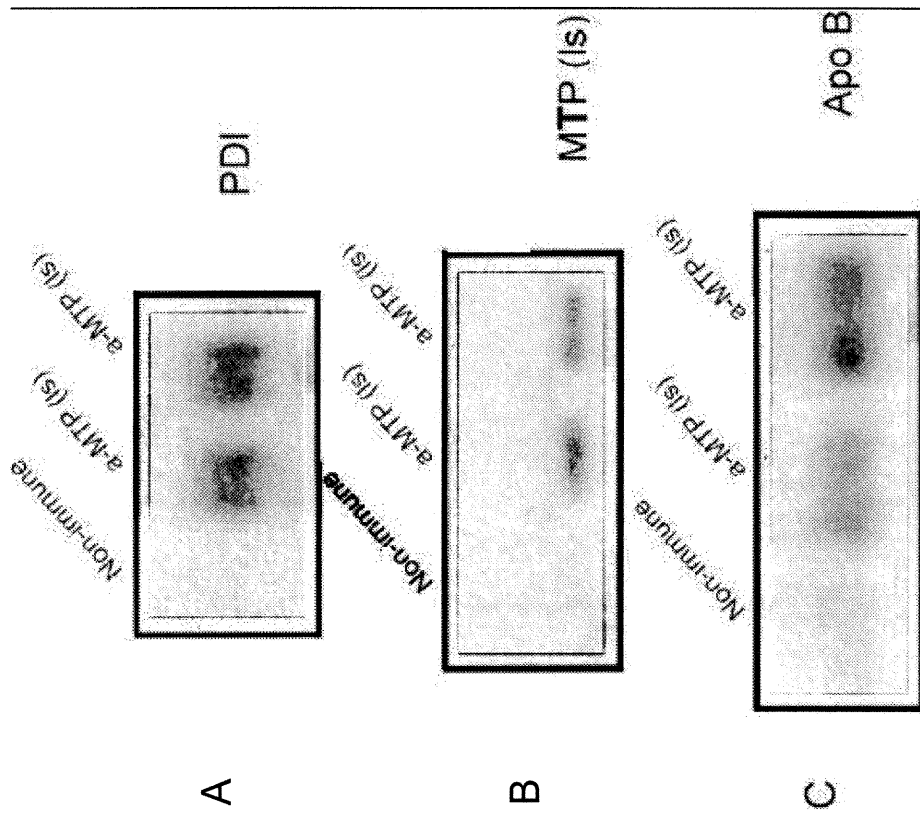


Figure 8

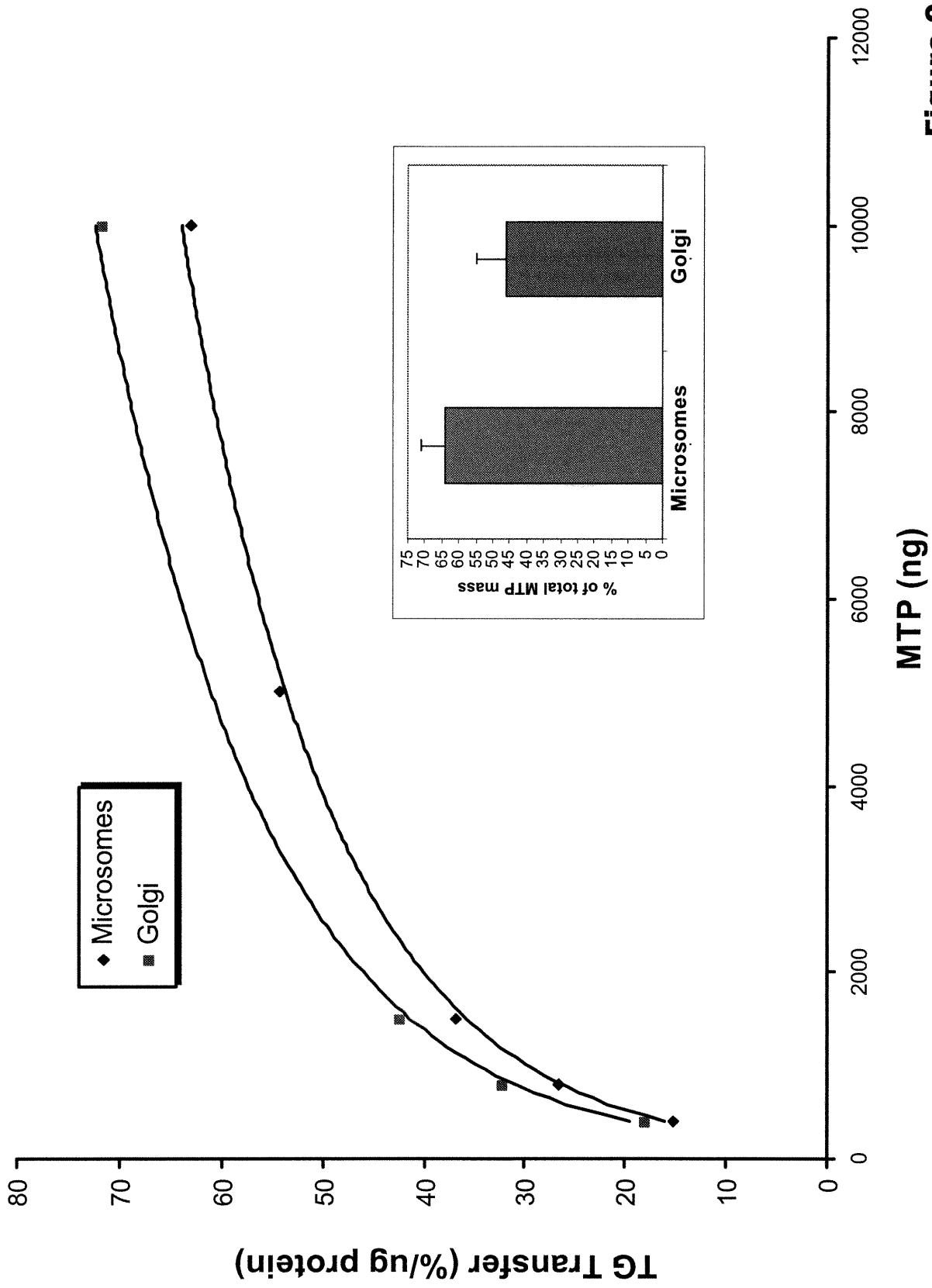


Figure 9

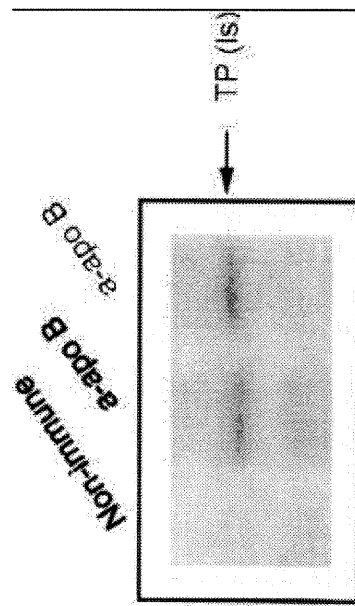


Figure 10

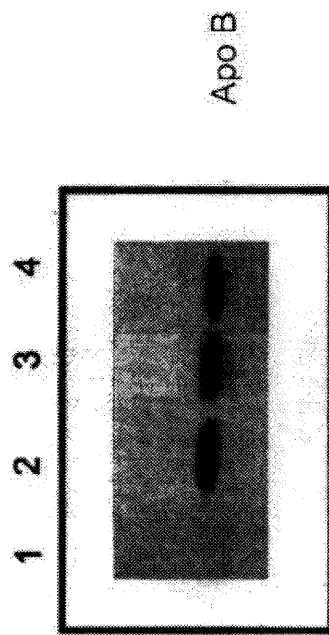


Figure 11

**IDENTIFICATION OF MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN
IN INTESTINAL BRUSH-BORDER MEMBRANE**

Isabelle Slight, Christiane Malo, Moise Bendayan, Edgard Delvin and Emile Levy

Research Center, Hôpital Sainte-Justine and
Departments of Biochemistry, Nutrition and Physiology,
University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5

Key Words: apical membrane, enterocytes, MTP, PDI, cytoskeleton

Address for correspondence:

Dr. Emile Levy
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montreal, Quebec H3T 1C5
Tel.: [REDACTED]
Fax: (514) 345-4999
E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) is a heterodimeric complex consisting of a unique 97 kDa subunit and protein disulfide isomerase (PDI 58 kDa). It plays an essential role in the assembly of lipoproteins by shuttling lipids between phospholipid membranes. Recent findings indicate the presence of MTP in the Golgi in addition to its conventional localization in the endoplasmic reticulum (ER) lumen. Focusing on the plasma membrane in this study, our attempts with immunoelectron microscopy and specific antibodies surprisingly revealed that labeling was not exclusively confined to the microsomes of rat absorptive cells. Immunogold labeling was also detected over the microvillus membrane of enterocytes with minimal association with the basolateral membrane. Western blot analysis and biochemical activity measurement confirmed MTP protein expression in brush-border membrane vesicles isolated from the intestinal epithelial cells of various species. Furthermore, MTP was co-expressed in microvilli membrane with PDI that is crucial to maintain the structure and activity of the MTP complex. The treatment of Caco-2 cells with nocodazole and colchicine blocked the appearance of MTP in the apical membrane. An assessment of MTP in lipoproteins did not disclose any signals, suggesting that MTP remained attached to the basolateral membrane and was not secreted with lipoproteins. In conclusion, the present studies suggest that MTP is present in the brush-border membrane of the enterocyte. Understanding the possible physiological role of MTP in this location may reveal additional functions.

INTRODUCTION

Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) is absolutely essential for the assembly and secretion of triglyceride-rich lipoproteins in the intestine and liver (1). It consists of two subunits of apparent molecular weight 88,000 and 58,000 (2,3). The large component confers the lipid transfer activity on the complex, whereas the small component, identified as protein disulfide isomerase (PDI), maintains the heterodimer in a soluble state. Defects in MTP gene cause abetalipoproteinemia (4-8). Patients with this genetic disease display malabsorption of dietary fat and lipid-soluble vitamins (9) that lead to the development of spinocerebellar and retinal degeneration (10).

It is now well established that MTP functions in regulating the production of apo B-containing lipoproteins (1,11). Most likely, MTP assists in the progressive translocation of nascent apo B from the ER membrane by loading this apolipoprotein with lipids (1,11,12). It has been reported that MTP is compartmentalized in the lumen of the ER where it catalyzes the transfer of triglycerides, cholesterol esters and phospholipids between membranes (13,14). It interacts with apo B and increases the lipidation of apo B polypeptides, which culminates in mature triglyceride-rich lipoprotein production, including chylomicrons by the enterocyte and VLDL by the hepatocyte (1,11,15,16).

Several important studies have dealt with the physiological role of MTP in intracellular lipid transport, including the reconstitution process of apo B-containing lipoproteins. So far, most of the reports have concentrated on the ER as the exclusive site for MTP action. However, MTP may function elsewhere in the cell given its great ability to bind, exchange and transfer a broad spectrum of neutral and polar lipid molecules (18),

which may allude to complementary functions. In particular, it would be important to investigate its presence in the plasma membrane of the enterocyte, which is known to interact actively with alimentary and biliary lipid molecules. As a framework for understanding additional MTP functions, a thorough exploration of its cellular distribution is necessary. We, therefore, examined carefully the immunolocalization of MTP in the plasma membrane of intestinal absorptive cells. We also addressed the question of whether PDI co-localizes with MTP at this site, thereby maintaining its catalytic transfer activity. Moreover, we compared MTP protein expression across various species. Finally, we explored the implication of cytoskeleton microtubules in the intracellular translocation of MTP to the brush-border membrane.

MATERIALS AND METHODS

Intestinal Specimens

Sprague Dawley rats were used for most of the experiments. Jejunal specimens were taken at the ligament of Treitz, washed and prepared for microscopy visualization and brush-border membrane preparation. Furthermore, caco-2 cells were used in a few studies in order to test the role of the cytoskeleton in MTP conveyance to the apical membrane.

Tissue Preparation for Electron Microscopy

Intestinal specimens were fixed by immersion in 1% glutaraldehyde 0.1 M phosphate-buffered (pH 7.4) for 2 h at 4°C and embedded in Lowicryl K4M at -20°C, according to our previously described procedures (19). Tissue blocks were examined by light microscopy to select well-oriented villus tips. Sections (60-80 nm) of the different tissue blocks were mounted on nickel grids with a carbon-coated Parlodion film and processed for immunocytochemistry.

Immunocytochemical Labeling

Protein A-gold immunocytochemical techniques were employed to detect the presence of MTP, PDI and apo B in rat intestinal tissue, as we described previously (20). Briefly, the tissue sections were initially washed in distilled water, incubated for 5 min on a drop of PBS containing 1% ovalbumin, and subsequently transferred to a drop of the PBS-diluted antibody (see below). After incubation (90 min) at room temperature, the grids were rinsed with PBS to remove unbound antibodies. They were transferred to the PBS ovalbumin (3 min) and incubated on a drop of protein A-gold (pH 7.2) for 30 min at room

temperature. The tissue sections were then thoroughly washed with PBS, rinsed with distilled water and dried. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before examination with a Phillips 410 electron microscope. Polyclonal antibodies were used at various dilutions (MTP 1/100, MTP large subunit 1/50, PDI 1/10, apo B 1/100) in combination with protein A-gold complexes, which were prepared using 5-nm or 10-nm gold particles according to our established techniques (21,22). Control experiments were performed to assess the specificity of the results. Excess purified MTP was added to the antibody solution. Incubation with this solution was followed by the protein A-gold complex. Pre-immune rabbit serum (diluted 1:10) was used on tissue sections before incubation with protein A-gold complex. Incubations were also performed with the protein A-gold complex alone, omitting the antibody step in order to test for nonspecific adsorption of the protein A-gold complex to tissue sections (22).

Double-labeling technique

In order to reveal the existence of MTP-PDI complex within the cellular compartments, double labeling techniques were applied. The tissue sections were simultaneously labeled for either MTP or PDI. The two-faced labeling technique (22,23) was applied in order to avoid any crossreaction between reagents. The small protein A-gold complex (5 nm) was used for the first labeling protocol, while the larger 10 nm protein A-gold complex was used for the second. This protocol allows for the simultaneous visualization of two antigens (MTP and PDI) in the same tissue section.

Antibodies

The antibodies for MTP, PDI and MTP large subunit were kindly provided by John Wetterau and Harris Jamil. These antibodies were characterized and utilized successfully in previous studies (3,25). Confirmation of the specificity of the antibodies was obtained when purified MTP large and small subunits were fractionated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with each polyclonal antibody.

Purification of Transfer Protein

The intestinal specimens were sonicated in 1 ml of 10 mM phosphate buffer (pH 6.8) containing saponin (100 µg/ml) and protease inhibitors (leupeptin 10 µg/ml, Trasylol 10 µg/ml, pepstatin A 1 µg/ml). The MTP-PDI heterodimer was separated by ultracentrifugation (100,000 g) and concentrated using a Centricon 30 cartridge (5000 rpm x 30 min).

MTP Activity Assay

The triglyceride transfer assay was adapted from previous reports (24-26). The MTP transfer activity was determined by evaluating the transfer of radiolabeled triacylglycerol between two populations of unilamellar vesicles, as described (30,39,43). The donor and receiver vesicles were prepared by adding the appropriate amount of lipids to 500 µl of chloroform, followed by drying under a stream of nitrogen, rehydration and probe-sonication in 1.25 ml of 15:35 buffer (15 mM Tris/HCl, pH 7.4, 35 mM NaCl, 0.05% BSA, 3 mM sodium azide, 1 mM EDTA). Donor vesicles contained, per assay, 4 nmol of egg yolk phosphatidylcholine, 0.33 nmol of cardiolipin and 0.024 nmol of [³H]-triolelylglycerol (Amersham). Receptor vesicles contained 24 nmol of egg yolk phosphatidylcholine, 0.048

nmol of trioleylglycerol and ~ 4000 cpm [¹⁴C] dipalmitoyl phosphatidylcholine (Amersham). Both categories of vesicles comprised 0.01% butylated hydroxytoluene. Various amounts of semi-purified MTP were incubated with 5 µl donor and receptor vesicles in a final volume of 100 µl for 1 h at 37°C. The reaction was quenched by adding 400 µl of ice-cold 15:35 buffer (without BSA). The negatively charged donor vesicles were removed from the reaction mixture by adsorption onto DEAE-cellulose (Whatman DE-52). The supernatant (containing the receptor vesicles) was collected after low-speed centrifugation (13000 g) and recentrifuged (13000 g) to assure the total removal of the DEAE-cellulose before scintillation counting. The ratio of [³H]-glycerol trioleate on [¹⁴C]-dipalmitoyl phosphatidylcholine was determined and the percentage lipid transfer was calculated from the increase in this ratio.

Preparation of Brush-border Membrane Vesicles

Mucosa from jejunal segments was scraped with a spatula onto a cold glass plate. Brush-border membrane vesicles (BBMV) were prepared, as previously described (27), by a calcium-based approach (28), which was reported to retain more enzyme activity than would magnesium-based methods (29).

Western Blot Analysis

The proteins were heated at 95°C for 5 min in SDS dithiothreitol and β-mercaptoethanol-containing sample buffer, fractionated by 7.5% SDS-PAGE and electrotransferred onto Hybond-ECL nitrocellulose membranes (Amersham, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) in 25 mmol/L Tris and 192 mmol/L glycine, as described previously (30-32). Membranes were blocked in Tris-buffered saline [20 mmol/L

Tris-HCl (pH 7.5) plus 137 mmol/L NaCl] containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk for 30 minutes at room temperature. The blot was then incubated overnight at 4°C in a blocking solution with the antibodies (1/500). Immune complexes were revealed by means of a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (IgG) and an enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham).

Caco-2 Cell Culture

Caco-2 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown in 75-cm² flasks (Corning, NY), as described previously (30,31). For individual experiments, cells were subcultured on 24.5-mm polycarbonate Transwell filter inserts with 0.4- μ m pores (Costar, Cambridge, MA) in MEM supplemented with 5% FBS. They were initially plated at a density of 1×10^6 cells/well in a medium refreshed every second day. Experiments were carried out at 20 days, a period at which Caco-2 cells are highly differentiated.

RESULTS

Properties of Polyclonal Antibodies

The antibody against the whole MTP complex immunoprecipitated MTP activity from Triton X-100-solubilized microvillar membranes and cell homogenates (Data not shown). Immunoisolated PDI and large MTP subunit had the apparent M_r on NaDodSO₄ gels under reducing conditions: 58 kDa (PDI) and 97 kDa (large MTP subunit), respectively. Under the non-reducing conditions the whole complex displays a ~150 kDa molecular weight. Furthermore, it was established that the preadsorption of the MTP antibody with its corresponding antigen prior to performing the immunocytochemical detection did not result in significant labeling in the enterocyte.

Immunoelectron Microscopy

To identify MTP components in intestinal specimens, we undertook an immunolabeling study. When the polyclonal antibody against the whole MTP complex was tested by the protein A-gold technique with thin sections from jejunal segments, intense labeling was revealed over microvilli, apical vesicles and basolateral membranes (Fig. 1). Control experiments confirmed the specificity of these results, since preadsorbed antibody with its antigen led to very weak labeling, particularly over microvilli and apical vesicles (Fig. 2). Additional control experiments argue in favor of the specificity of the antibodies directed against PDI and the MTP large subunit (Results not shown).

The antibodies used in the second set of experiments were separately tested against their specific MTP complex components. Again, they recognized the targeted proteins, MTP

large subunit (Fig. 3) and PDI (Fig. 4), over microvilli, apical vesicles and basolateral membranes.

Finally, the double immunocytochemical detection of PDI and MTP large subunit was carried out (Fig. 5). MTP large subunit was revealed by 5-nm protein A-gold and PDI with 10-nm protein A-gold. Both particles colocalized over similar enterocyte sites.

Protein Transfer Activity Assay and Western Blot Analysis

To confirm the presence of PDI and MTP in the apical membrane of the intestinal epithelium, brush-border membrane vesicles (BBMV) were isolated from rat, rabbit, dog, pig and human jejunum. Using a combination of SDS-PAGE and chemiluminescence Western blot analysis, both the large MTP subunit and PDI were detected on the BBMV of rats (Fig. 6), rabbits (Fig. 7), dogs (Fig. 8), pigs (Fig. 9) and humans (Fig. 10). As shown in Table 1, the MTP/PDI ratio in human BBMV was ~2-fold that of rat, dog and rabbit and 4-fold that of pig BBMV. The identification of both subunits in BBMV suggested that the MTP complex could maintain its catalytic activity. In order to test this hypothesis, MTP transfer activity was assessed using the transport of [¹⁴C]-trioleoyl glycerol from donor to acceptor small unilamellar vesicles. Our results demonstrated shuttling of the labeled substrate at varying protein concentrations of rat (Fig. 6), rabbit (Fig. 7), dog (Fig. 8), pig (Fig. 9) and human (Fig. 10) BBMV. Overall, these data indicate that MTP components are present in apical microvilli and they interact allowing the catalytically active structure of the MTP complex. Finally, the data recorded in Table 2 underline the predominant MTP activity of human BBMV compared with that of the other species studied.

Involvement of the Cytoskeleton in MTP Transport

Caco-2 cells were utilized in order to determine whether the cytoskeleton is involved in the control of MTP movement. First, electron microscopic and cytochemical studies were undertaken to ascertain the presence of MTP in the microvillar membrane. Immunolabeling of both PDI and MTP large subunit was observed, particularly at the apical and basolateral membrane (Fig. 11). Second, protein transfer assay and Western blot analysis were carried out in isolated BBMV. They confirmed the location of MTP complex in the apical membrane of Caco-2 cells (Fig. 12). Finally, Caco-2 cells were pre-incubated with colchicine and nocodazole in order to define the contribution of the cytoskeleton in the translocation of MTP components from the secretory pathway to the apical plasma membrane (Fig. 13). The exposure of Caco-2 cells to these drugs, leading to the disassembly of the cytoskeleton, resulted in a marked decrease in the expression of PDI and MTP large subunit in BBMV. It seems, therefore, that the appearance of MTP in BBMV depends on the state of cytoskeletal organization, which is likely involved in MTP trafficking processes between the intracellular compartment and luminal membrane.

The Association of MTP with Lipoproteins

Our immunocytochemical studies revealed MTP labeling over the basolateral membrane. In order to determine whether these results indicate that MTP is secreted along with lipoproteins, MTP was assessed in TG-rich lipoproteins, freshly isolated from Caco-2 basolateral medium (Fig. 14) or from human plasma (Fig. 15). Western blot analysis could not reveal any MTP signals in lipoprotein particles.

DISCUSSION

One of the major aims of our studies was to evaluate whether MTP is detectable in new intracellular regions of the enterocyte. Our data confirm and extend recent work pointing out the presence of MTP in the Golgi apparatus (20). The results reported here clearly show that MTP has not been exclusively confined to the lipoprotein secretory pathway. MTP has now been found in the brush-border membrane, colocalized with PDI, and it maintained its catalytic activity. Nocodazole and colchicine inhibited its appearance in microvilli.

Existing data addressing the location of MTP in the enterocyte are limited. Based on the subfractionation of crude liver homogenate, it was concluded that MTP is an integral protein of microsomes (32). This is quite consistent with the concept that the formation of apo B-containing lipoproteins is initiated in the ER (33). MTP involvement is obligatory for the proper folding and lipidation of apo B during the cotranslational phase of lipoprotein assembly (1,33). Our recent observations have documented the presence of MTP in the Golgi apparatus and emphasized its interaction with apo B, which facilitates lipoprotein synthesis (20). New support is now provided in favor of MTP location in the plasma membrane. Whether MTP functions to achieve lipid transport between membranes, acts as an independent chaperone or fulfills a structural role will require further investigation. Nevertheless, it has been well established that phospholipids are synthesized by the ER and deposited in the cytosolic leaflet of biogenic membranes (34). These lipids must be transported across the bilayer to populate the exoplasmic leaflet for membrane growth. Transport does not occur spontaneously and it is presumed that specific membrane proteins, flippases, are responsible for PL flip-flop (35). In this conjecture, previous kinetic analyses

revealed that MTP transports lipid between membranes by a shuttle mechanism (ping-pong bi-bi kinetics) (36), indicating that MTP binds and transports lipid molecules between membranes. In this shuttle mechanism, the transfer protein binds to a donor membrane and extracts lipid molecules. The transfer protein containing the bound lipid then dissociates from the membrane and diffuses to a second membrane where it binds and deposits the lipid molecules. Is MTP a part of the flippases responsible for the flip-flop of endogenous and/or exogenous PL during apical membrane bilayer assembly? If so, what are the discrete steps and specific events in which MTP is involved? It is conceivable that answers to these issues will be found through further experimental approaches.

PDI is a protein-thiol oxidoreductase that catalyzes both the oxidation and isomerization of disulfides on nascent polypeptides in the ER (37). It also mediates the reduction of protein disulfides under the reducing conditions of the cytoplasm, endosomes and cell surface. At these locations, PDI participates in the regulation of receptor function, cell-cell interaction, gene expression and actin filament polymerization (37). Other suggested PDI functions are to serve as a chaperone-like protein, explaining the formation of a protein dimer with the large subunit of MTP that is kept in a catalically active, non-aggregated conformation (38). In our studies, we showed that PDI co-localized with the MTP large subunit at the brush-border membrane. Compelling evidence for this association was obtained by enterocyte immunoelectron microscopy and BBMV Western blot analysis. Furthermore, microvillar membrane vesicles retained appreciable MTP transfer activity.

Our findings imply that intracellular mechanisms are available to convey both PDI and MTP large subunit to the cell surface. It is generally accepted that membrane proteins of eukaryotic cells are synthesized and assembled in the ER, pass through the Golgi apparatus,

and are delivered to the basolateral membrane before insertion into the apical membrane (39,40). In our series of immunocytochemical experiments, labeling of MTP in the apical membrane largely dominates basolateral membrane labeling. How and by which route can MTP end up in the brush-border membrane? Through electron micrograph inspection, labeling of MTP is obvious in the ER, Golgi apparatus, basolateral membrane and apical membrane, which may constitute indirect evidence compatible with the proposed protein sorting model. However, one should be very cautious not to rush to this conclusion, since other intracellular pathways of protein traffic in intestinal epithelial cells are possible, including direct apical transport from the Golgi network, the route of basolateral-to-apical transcytosis via basolateral early endosomes or partial missorting of MTP (41). Undoubtedly, the cytoskeleton actively participates in membrane traffic, given that transport vesicles cannot find their target organelles by random diffusion over long intracellular distances. It is now obvious that the cytoskeleton plays an essential role in trafficking or sorting, since (a) it provides tracks on which vesicles ride to specific cellular locations, (b) it supports efficient transport by maintaining organelle architecture, (c) it actively and selectively participates in vesicle budding and/or fusion, and (d) it retains certain proteins to specific membrane domains (42). In our studies, we have used chemical agents that disturb microtubules, the most important determinants of the cytoskeleton (43,44). The addition of colchicine and nocodazole reduced the MTP expression in the brush-border membrane, indicating that intracellular trafficking of MTP requires an intact microtubular network. Previous reports have shown that the direct Golgi-to-brush-border pathway is severely inhibited when microtubules are depolymerized (41). Based on these data, one may suggest that microtubules provide tracks and facilitate MTP-containing vesicle transport from the trans-Golgi network to the brush-border membrane and along the transcytotic pathway.

ACKNOWLEDGMENT

This paper was supported by research grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10584) as well as Research Scholarship Awards from the FRSQ (EL). The authors thank Drs. JR Wetterau and H Jamil for the polyclonal antibodies. We also acknowledge the expert secretarial assistance of Danielle St-Cyr Huot.

LEGENDS

- Figure 1:** Immunocytochemical detection of MTP in rat jejunal enterocytes. Protein A-gold immunocytochemical technique was applied with the polyclonal antibody directed against heterodimer MTP. The labelling by gold particles revealed MTP antigenic sites over the apical region (A) and the basal region (B) of the enterocytes. mv, microvilli; v, apical vesicles; m, mitochondria; blm, basolateral membrane. X 40,000.
- Figure 2:** Control experiment for the immunocytochemical detection of MTP in rat jejunal enterocytes. This was carried out by preadsorbing the MTP antibody with its corresponding antigen prior to performing immunocytochemical detection. mv, microvilli; v, apical vesicles; m, mitochondria. X 35,000.
- Figure 3:** Immunocytochemical detection of the MTP large subunit in rat jejunal enterocytes. A specific polyclonal antibody directed against the 97 kDa MTP large subunit was employed in combination with protein A-gold. mv, microvilli; v, apical vesicles; m, mitochondria. X 30,000.
- Figure 4:** Immunocytochemical detection of PDI in rat jejunal enterocytes. Protein A-gold was used in combination with a specific polyclonal antibody directed against the PDI small 57 kDa subunit of MTP. Labelling was localized along the apical region (A) and the basolateral side (B). mv, microvilli; v, apical vesicles; blm, basolateral membrane. X 30,000.
- Figure 5:** Double immunocytochemical detection of MTP large subunit and PDI. The MTP large subunit was revealed by 5-nm protein A-gold, while PDI was

visualized by 10-nm protein A-gold. Some of the associations between the two labels appearing as doublets are circled. mv, microvilli; v, apical vesicles; blm, basolateral membrane. A X 40,000; B X 50,000.

Figure 6: Activity assay and Western blot analysis of MTP in BBMV isolated from rat jejunum. The MTP-mediated transfer was measured with an *in vitro* assay based on the percentage of radiolabeled triglyceride from donor small unilamellar vesicles to recipient small unilamellar vesicles (A), as described under "Materials and Methods." The assay contained 500-2000 ng of partially-purified MTP and the reaction was carried out for 1 h at 37°C. Values represent data carried out in triplicate. The immunoreactive products were detected as a function of BBMV protein concentration with anti-MTP large subunit (B) and anti-PDI (C) antibodies. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody.

Figure 7: Activity assay and Western blot analysis of MTP in BBMV isolated from rabbit jejunum. The MTP-mediated transfer was measured with an *in vitro* assay based on the percentage of radiolabeled triglyceride from donor small unilamellar vesicles to recipient small unilamellar vesicles (A), as described under "Materials and Methods." The assay contained 500-2000 ng of partially-purified MTP and the reaction was carried out for 1 h at 37°C. Values represent data carried out in triplicate. The immunoreactive products were detected as a function of BBMV protein concentration with anti-MTP large subunit (B) and anti-PDI (C) antibodies. The relative amount of

primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody.

Figure 8: Activity assay and Western blot analysis of MTP in BBMV isolated from dog jejunum. The MTP-mediated transfer was measured with an *in vitro* assay based on the percentage of radiolabeled triglyceride from donor small unilamellar vesicles to recipient small unilamellar vesicles (A), as described under "Materials and Methods." The assay contained 500-2000 ng of partially-purified MTP and the reaction was carried out for 1 h at 37°C. Values represent data carried out in triplicate. The immunoreactive products were detected as a function of BBMV protein concentration with anti-MTP large subunit (B) and anti-PDI (C) antibodies. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody.

Figure 9: Activity assay and Western blot analysis of MTP in BBMV isolated from pig jejunum. The MTP-mediated transfer was measured with an *in vitro* assay based on the percentage of radiolabeled triglyceride from donor small unilamellar vesicles to recipient small unilamellar vesicles (A), as described under "Materials and Methods." The assay contained 500-2000 ng of partially-purified MTP and the reaction was carried out for 1 h at 37°C. Values represent data carried out in triplicate. The immunoreactive products were detected as a function of BBMV protein concentration with anti-MTP large subunit (B) and anti-PDI (C) antibodies. The relative amount of

primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody.

Figure 10: Activity assay and Western blot analysis of MTP in BBMV isolated from human jejunum. The MTP-mediated transfer was measured with an *in vitro* assay based on the percentage of radiolabeled triglyceride from donor small unilamellar vesicles to recipient small unilamellar vesicles (A), as described under "Materials and Methods." The assay contained 250-1000 ng of partially-purified MTP and the reaction was carried out for 1 h at 37°C. Values represent data carried out in triplicate. The immunoreactive products were detected as a function of BBMV protein concentration with anti-MTP large subunit (B) and anti-PDI (C) antibodies. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody.

Figure 11: Immunocytochemical detection of MTP in Caco-2 cells. Protein A-gold immunocytochemical technique was applied with the polyclonal antibody directed against MTP (A) and PDI (B). The gold particles revealing the corresponding antigenic sites are seen associated with the membrane of the microvilli (mv). Some particles are also associated with the limiting membrane of vesicular profiles (arrows) in the apical region of the cell. A X 50,000; B X 60,000.

Figure 12: Activity assay and Western blot analysis of MTP in BBMV isolated from Caco-2 cells. The MTP-mediated transfer was measured with an *in vitro* assay based on the percentage of radiolabeled triglyceride from donor small

unilamellar vesicles to recipient small unilamellar vesicles (A), as described under "Materials and Methods." The assay contained 2000 and 5000 ng of partially-purified MTP and the reaction was carried out for 1 h at 37°C. Values represent data carried out in triplicate. The immunoreactive products were detected as a function of BBMV protein concentration with anti-MTP large subunit (B) and anti-PDI (C) antibodies. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody.

Figure 13: MTP expression in BBMV isolated from Caco-2 cells incubated with colchicine (A) and nocodazole (B). Immunoblot of BBMV protein was carried out after a 4-h cell incubation. Equal amounts of BBMV were separated on 7,5% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and MTP large subunit was detected using specific polyclonal antibodies.

Figure 14: Detection of MTP (A) and PDI (B) in TG-rich lipoproteins from Caco-2 cells. Basolateral medium was evaluated by Western blot analysis. The samples were run on 7,5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was blotted with specific anti-MTP and anti-PDI polyclonal antibodies.

Figure 15: Detection of MTP (A) and PDI (B) in TG-rich lipoproteins isolated from human plasma. VLDL and chylomicrons (CM) were evaluated by Western blot analysis. The samples were run on 7,5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was blotted with specific anti-MTP and anti-PDI polyclonal antibodies.

REFERENCES

1. Wetterau JR, Lin MC, Jamil H. Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochim Biophys Acta* 1997;1345:136-150.
2. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Laplaud PM, McLean LR. Structural properties of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *Biochemistry* 1991;30:4406-4412.
3. Wetterau JR, Combs KA, Spinner SN, Joiner BJ. Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J Biol Chem* 1990;265:9800-9807.
4. Narcisi TME, Shoulders CC, Chester SA, Read J, Brett DJ, Harrison GB, Grantham TT, Fox MF, Povey S, de Bruin TWA, et al. *Am J Hum Genet* 1995;57:1298-1310.
5. Rehberg EF, Samson-Bouma M-E, Kienzle B, Blinderman L, Jamil H, Wetterau JR, Aggerbeck LP, Gordon DA. *J Biol Chem* 1996;271:29945-29952.
6. Ricci B, Sharp D, O'Rourke E, Kienzle B, Blinderman L, Gordon D, Smith-Monroy C, Robinson G, Gregg RE, Rader DJ, Wetterau JR. *J Biol Chem* 1995;270:14281-14285.
7. Sharp D, Blinderman L, Combs KA, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, Gil CM, Turck CW, Bouma ME, Rader DJ, et al. *Nature (London)* 1993;365:65-69.
8. Shoulders CC, Brett DJ, Bayliss JD, Narcisi TM, Jarmuz A, Grantham TT, Leoni PRD, Bhattacharya S, Pease RJ, Cullen PM, et al. *Hum Mol Genet* 1993;2:2109-2116.

9. Kane JP, Havel RJ. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. McGraw-Hill, New York, 1989, pp 1139-1164.
10. Muller DPR, Lloyd JK, Woolff OH. *Lancet* 1983;i:225-228.
11. van Greevenbroek MMJ, Robertus-Teunissen MG, Erkelens DW, de Bruin Tjerk WA. Participation of the microsomal triglyceride transfer protein in lipoprotein assembly in Caco-2 cells: interaction with saturated and unsaturated dietary fatty acids. *J Lipid Res* 1998;39:173-185.
12. Bakillah A, Hussain MM. Binding of microsomal triglyceride transfer protein to lipids results in increased affinity for apolipoprotein B: Evidence for stable microsomal MTP/lipid complexes. *J Biol Chem* 2001;Jun 26 [epub ahead of print].
13. Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:151-157.
14. Wetterau JR, Lin MC, Jamil H. Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochim Biophys Acta* 1997;1345:136-150.
15. Patel SB, Grundy SM. Interactions between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B within the endoplasmic reticulum in a heterologous expression system. *J Biol Chem* 1996;271:18686-18694.
16. Wu X, Zhou M, Huang LS, Wetterau J, Ginsberg HN. Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of apo B-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 1996;271:10277-10281.

17. Levy E, Stan S, Delvin E, Ménard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G, Bendayan M. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: Possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 2001 (Submitted).
18. Jamil H, Dickson JK Jr, Chu CH, Lago MW, Rinehart JK, Biller SA, Gregg RE, Wetterau JR. *J Biol Chem* 1995;270:6549-6554.
19. Bendayan M. Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: methods, applications, and limitations. *J Electron Microsc Tech* 1984;1:253-270.
20. Levy E, Ménard D, Delvin E, Stan S, Mitchell G, Lambert M, Ziv E, Feoli-Fonseca JC, Seidman E. The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem* 2001, Aug 3 [epub ahead of print].
21. Levy E, Rochette C, Londono I, Roy CC, Milne RW, Marcel YL, Bendayan M. Apolipoprotein B-100: immunolocalization and synthesis in human intestinal mucosa. *J Lipid Res* 1990;31:1937-1946.
22. Bendayan M. Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Chem* 1995;29:1-163.
23. Bendayan M. Double immunocytochemical labeling applying the protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem* 1982;30:81-85.

24. Wetterau JR, Zilversmit DB. Purification and characterization of microsomal triglyceride and cholesteryl ester transfer protein from bovine liver microsomes. *Chem Phys Lipids* 1985;38:205-222.
25. Leiper JM, Mayliss JD, Perse RJ, Brett DJ, Scott J, Shoulders CC. Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene products, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. *J Biol Chem* 1994;269:21951-21954.
26. Levy E, Stan S, Garofalo C, Delvin EE, Seidman EG, Ménard D. Immunolocalization, ontogeny and regulation of microsomal triglyceride transfer protein in human fetal intestine. *Am J Physiol* 2001;280:G563-G571.
27. Malo C. Kinetic evidence for heterogeneity in Na⁺-D-glucose cotransport systems in the normal fetal small intestine. *Biochim Biophys Acta* 1988;938:181-188.
28. Schmitz J, Preiser H, Maestracci D, Bosh BK, Cerda JJ, Crane RK. Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1973;323:98-112.
29. Ibrahim SA, Balasubramanian KA. Comparative study on brush border membranes prepared from rat and monkey small intestine by Ca²⁺ and Mg²⁺ precipitation. *Comp Biochem Physiol* 1995;112B:65-69.
30. Stan S, Delvin E, Rouleau T, Steinmetz A, Levy E. Modulation of apo A-IV transcript levels and synthesis by n-3, n-6 and n-9 fatty acids in Caco-2 cells. *J Cell Biochem* 1999;75:73-81.

31. Levy E, Beaulieu JF, Delvin E, Seidman E, Yotov W, Basque JR, Ménard D. Human crypt intestinal epithelial cells are capable of lipid production, apolipoprotein synthesis, and lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 2000;41:12-22.
32. Levy E, Sinnott D, Thibault L, Nguyen TD, Delvin E, Ménard D. Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Letter* 1996;393:253-258.
33. Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:151-157.
34. Menon AK, Watkins WE3rd, Hrafnisdottir S. Specific proteins are required to translocate phosphatidylcholine bidirectionally across the endoplasmic reticulum. *Curr Biol* 2000;10:241-252.
35. Daleka DL, Lyles JV. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:108-127.
36. Atzel A, Wetterau JR. *Biochemistry* 1993;32:10444-10450.
37. Noiva R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10:481-493.
38. Lamberg A, Jauhiainen M, Metso J, Ehnholm C, Shoulders C, Scott J, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. The role of protein disulphide isomerase in the microsomal triacylglycerol transfer protein does not reside in its isomerase activity. *Biochem J* 1996;315:533-536.
39. Sabatini DD, Kreibich G, Morimoto T, Adesnik M. *J Cell Biol* 1982;92:1-22.

40. Dautry-Varsat A, Lodish HF. Trends Neurol Sci 1983;6:484-490.
41. Hauri HP, Matter K. Protein traffic in intestinal epithelial cells. Semin Cell Biol 1991;2:355-364.
42. Kelly RB. Microtubules, membrane traffic, and cell organization. Cell 1990;61:5-7.
43. Downing KH. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. Annu Rev Cell Dev Biol 2000;16:89-111.
44. Iwasaki S. Natural organic compounds that affect to microtubule functions. Yakugaku Zasshi 1998;118:112-126.

Table 1. MTP/PDI ratios at the level of microvilli of different species.

Ratio	Human	Rat	Dog	Pig	Rabbit
MTP / PDI	2,28	1,01	1,38	0,59	1,20

Table 2. Comparison of the MTP triglyceride transfer activity in microvilli isolated from different species.

Species	MTP
Rabbit / Human	0,80
Dog / Human	0,43
Rat / Human	0,36
Pig / Human	0,33

Figure 1

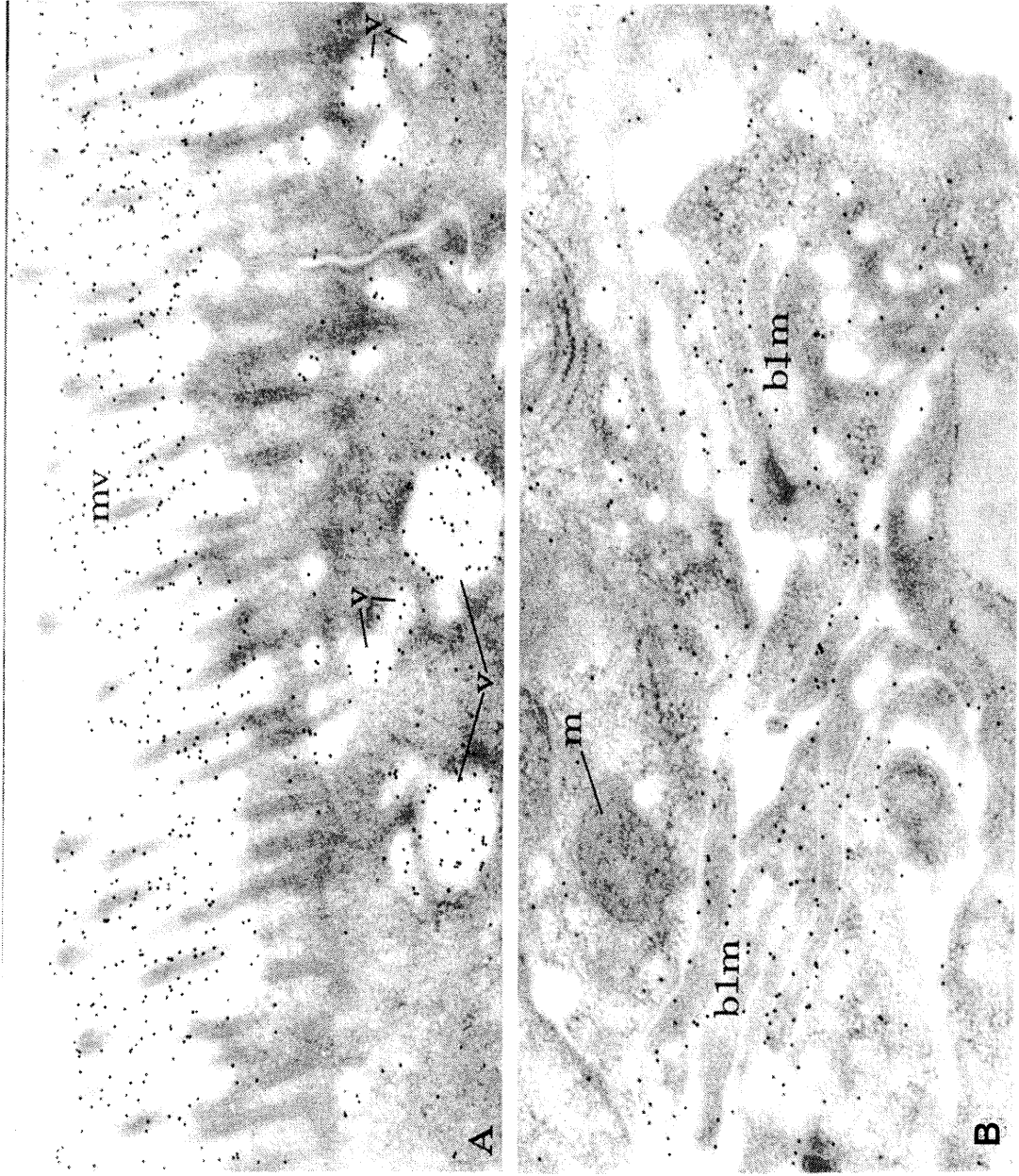


Figure 2

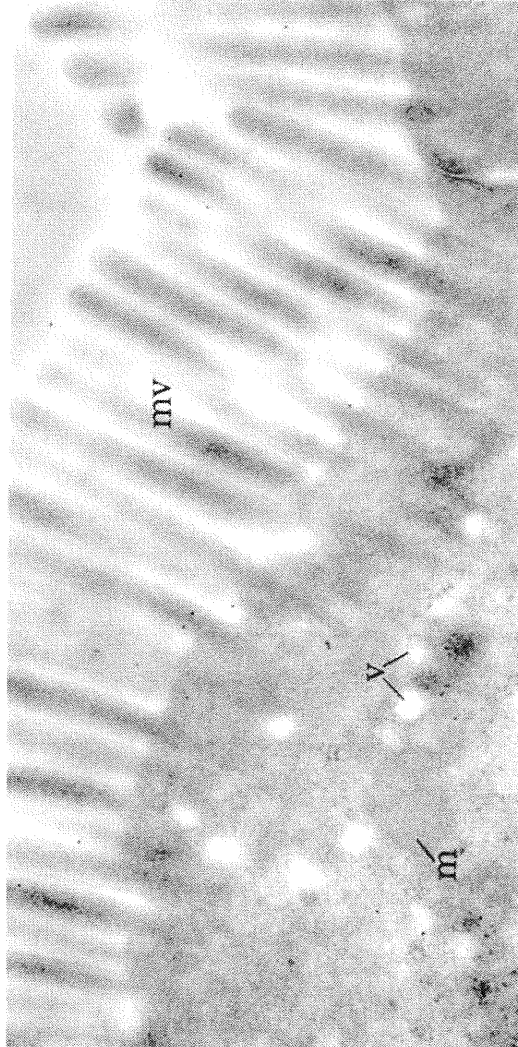


Figure 3

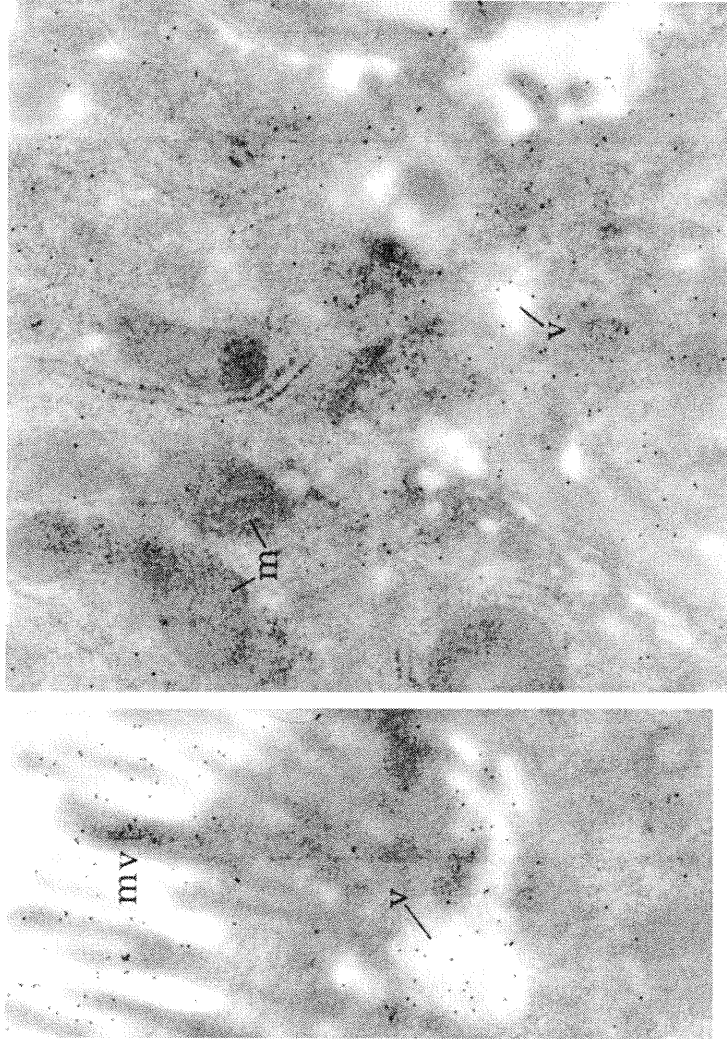


Figure 4

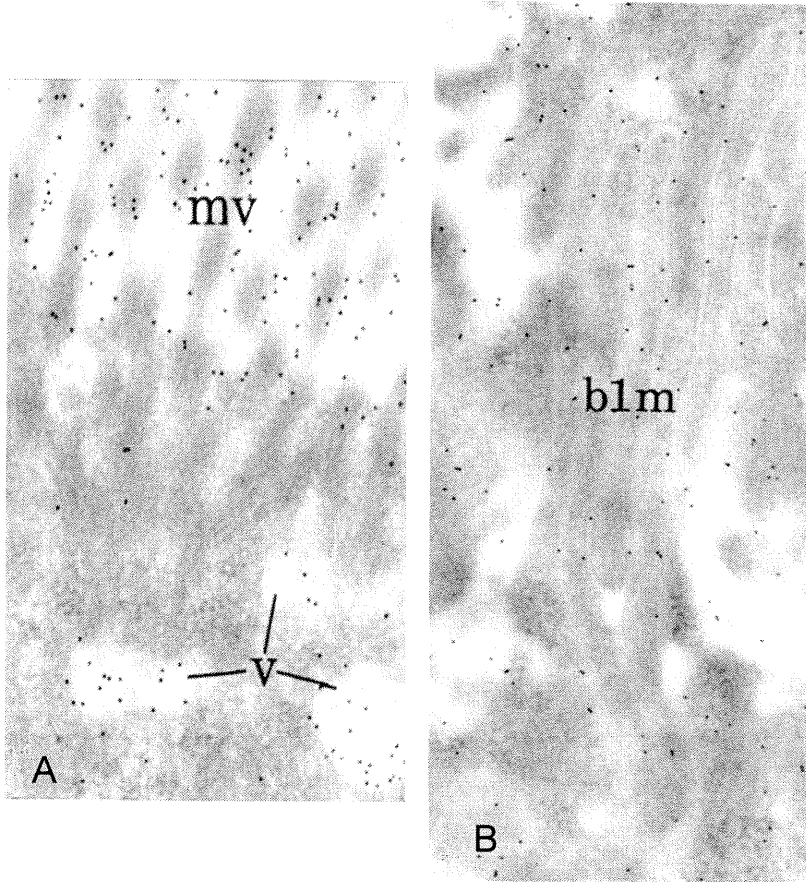


Figure 5

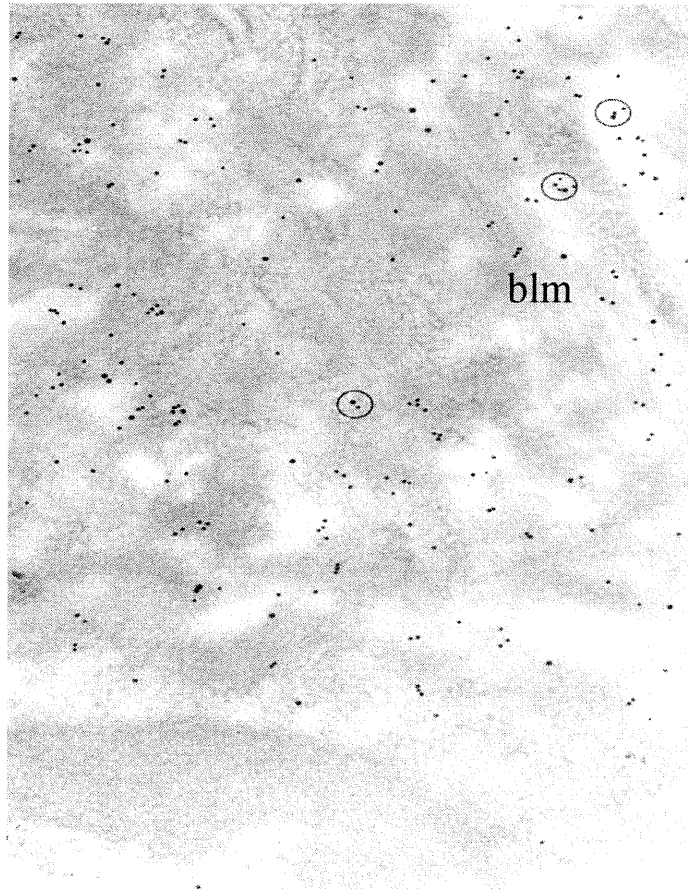
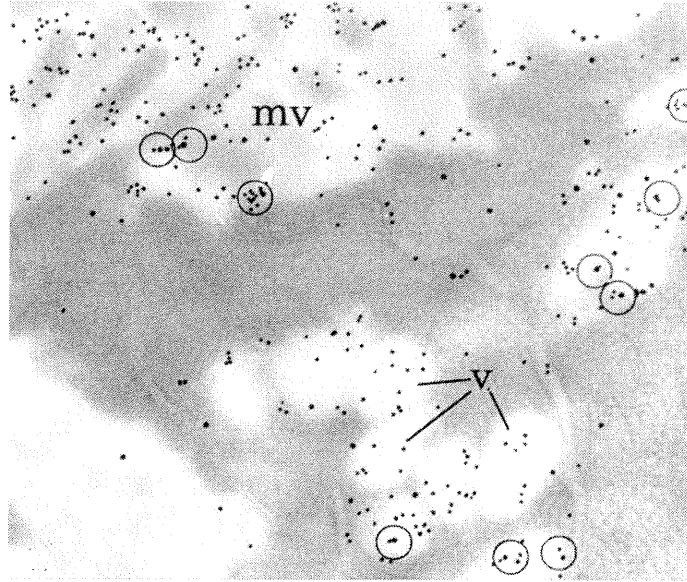
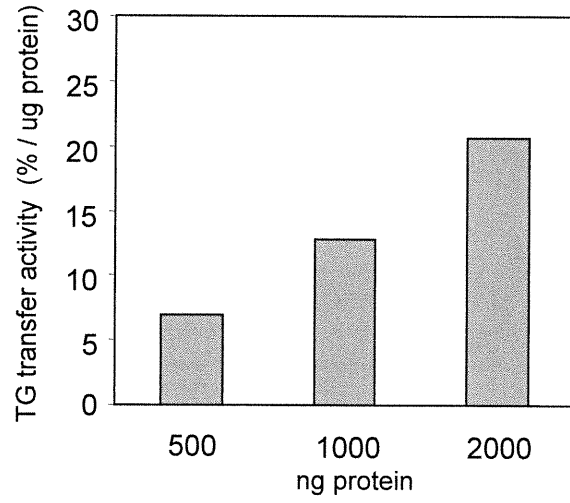
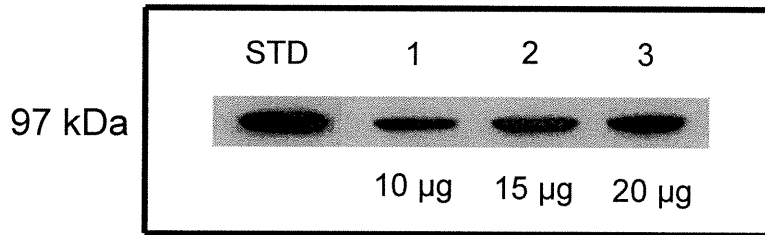


Figure 6

A.



B.



C.

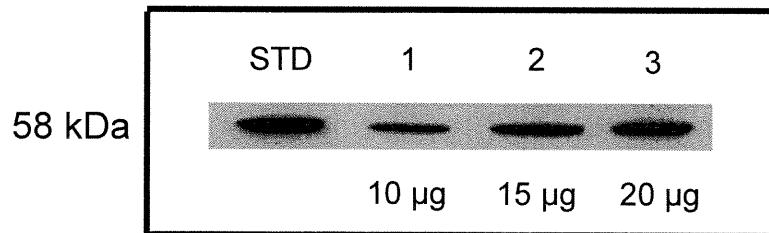
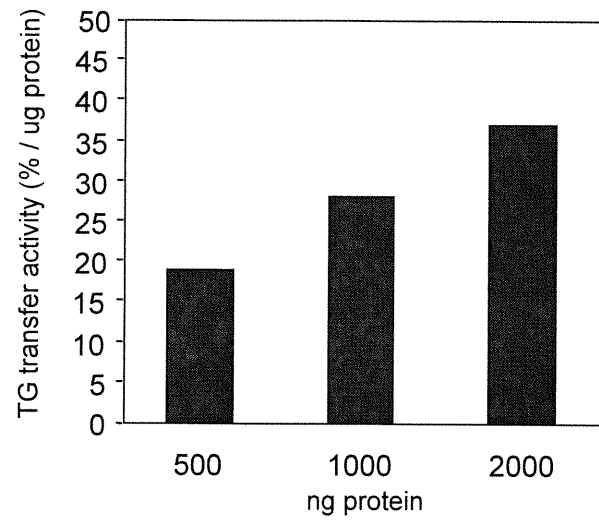
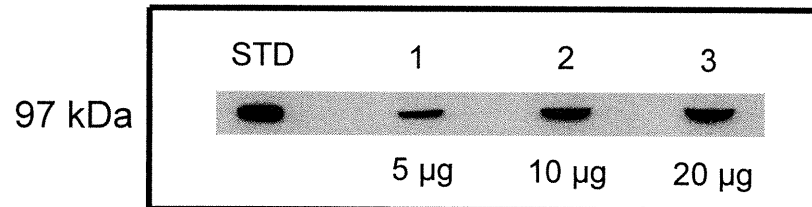


Figure 7

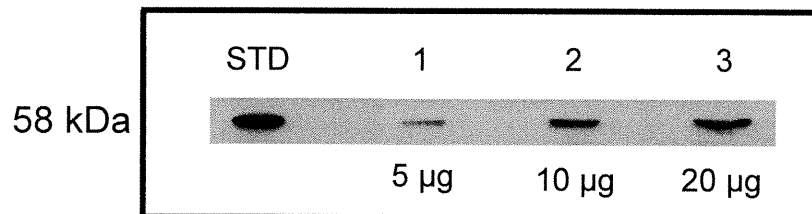
A.



B.

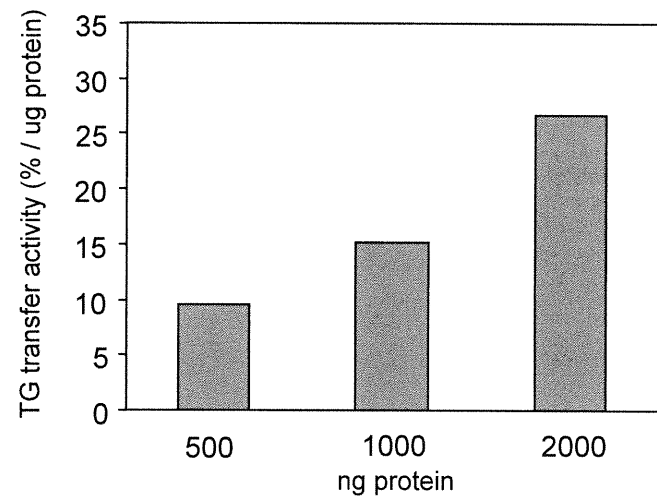


C.

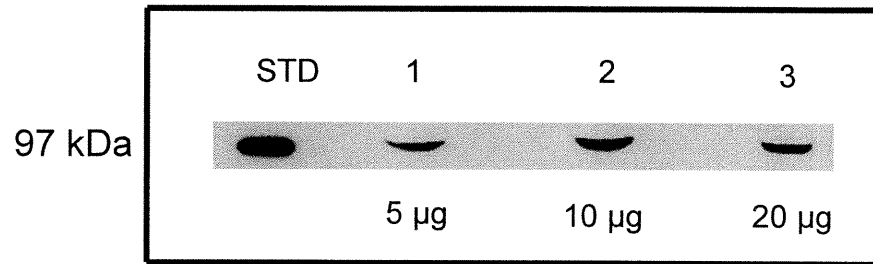


A.

Figure 8



B.



C.

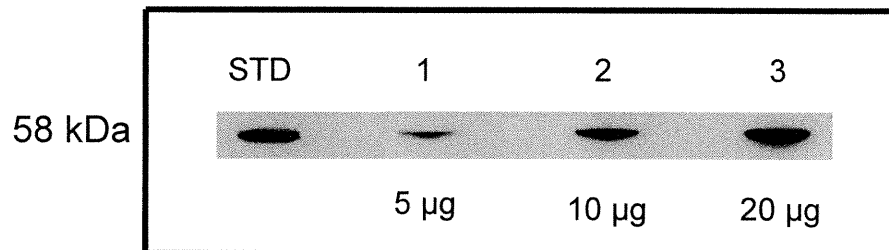
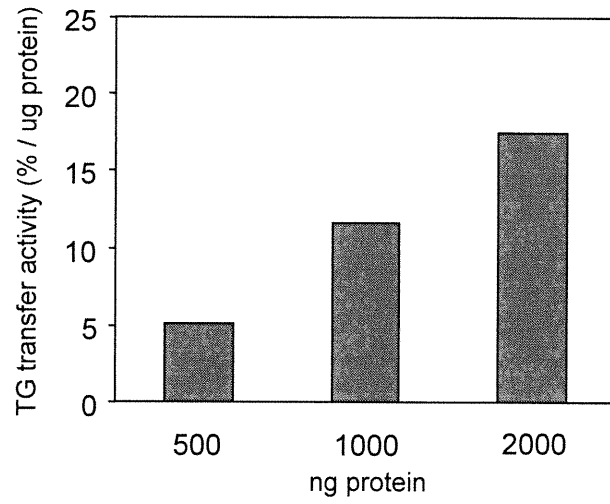
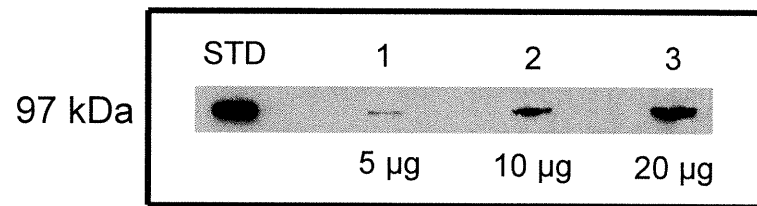


Figure 9

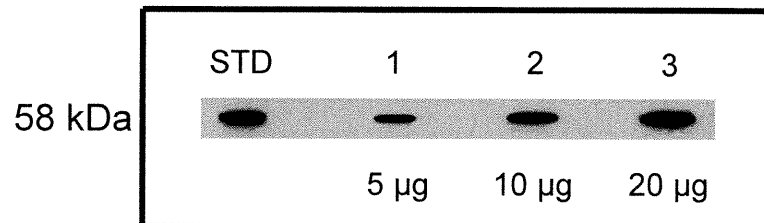
A.



B.

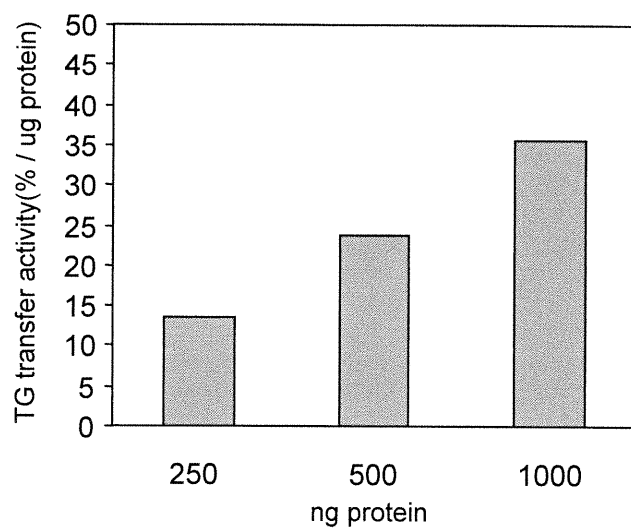


C.

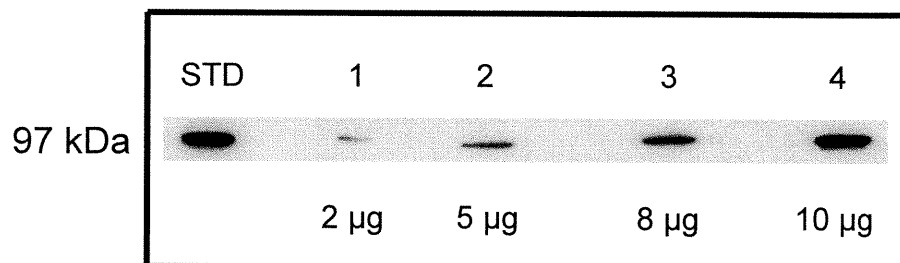


A.

Figure 10



B.



C.

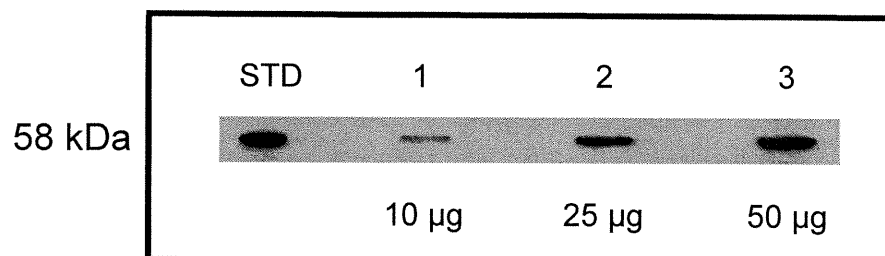


Figure 11

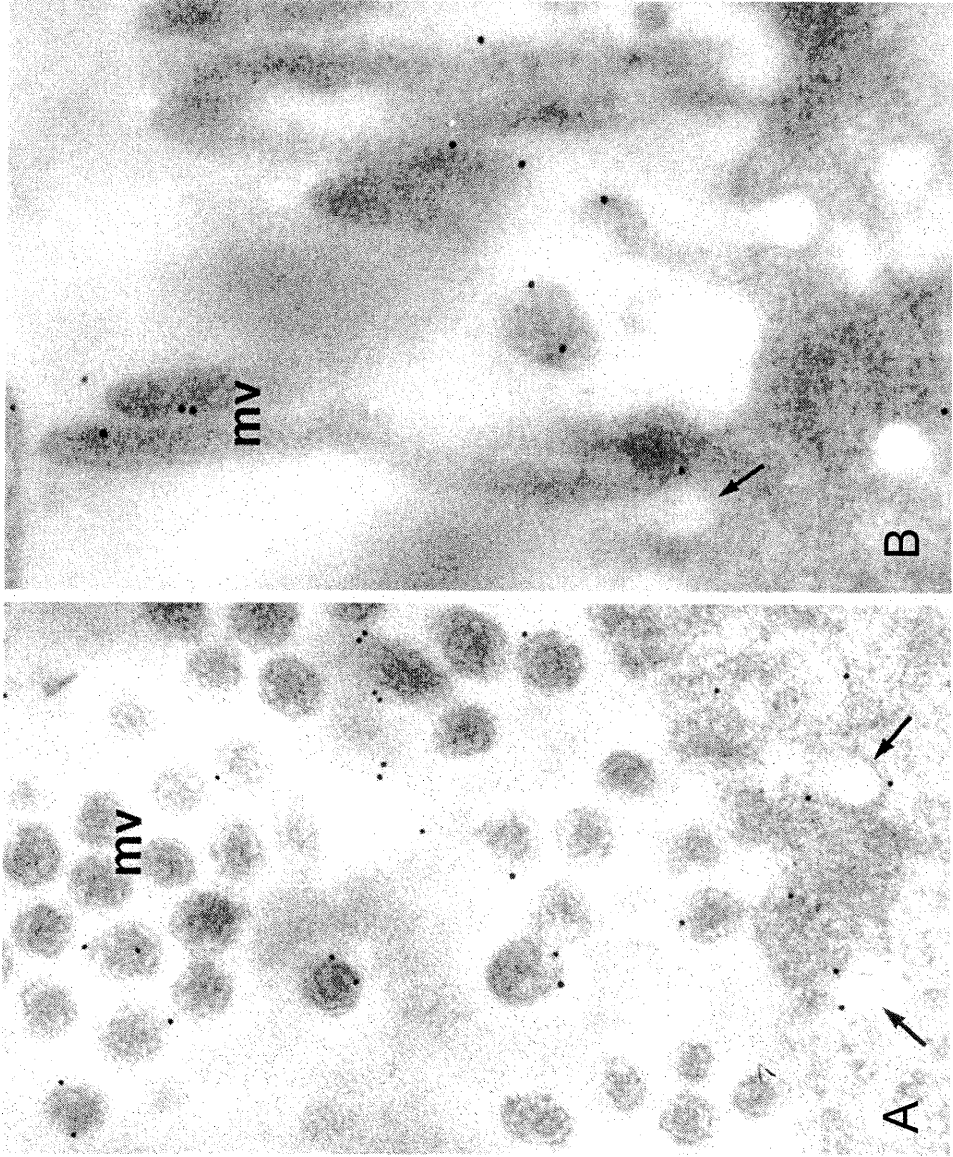
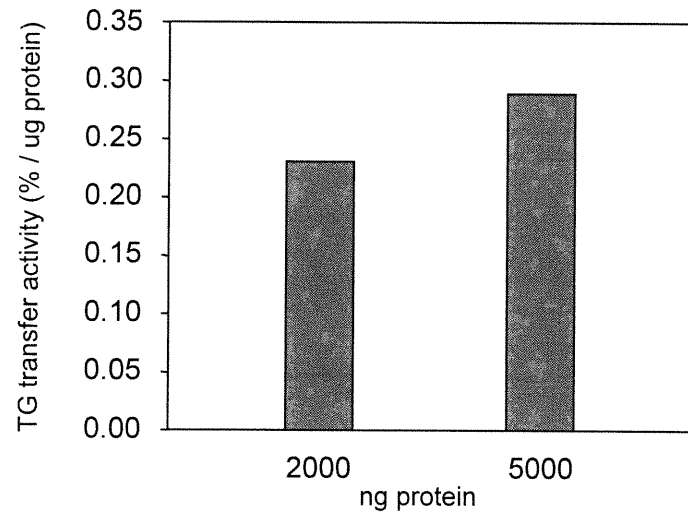
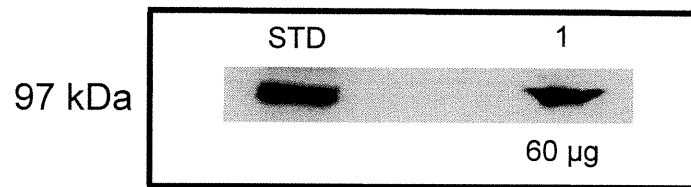
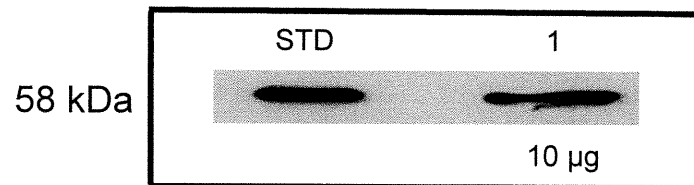
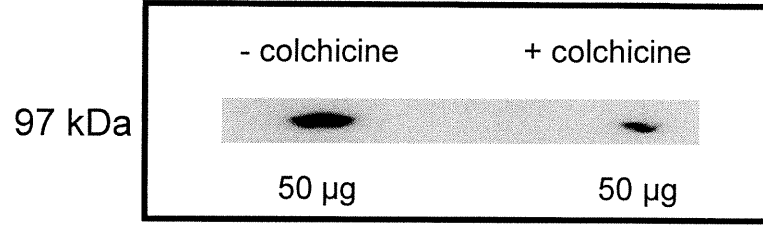


Figure 12

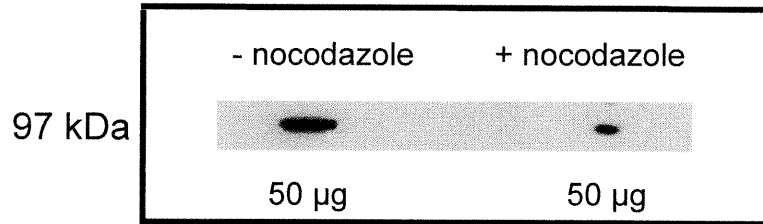
A.**B.****C.**

A.

Figure 13

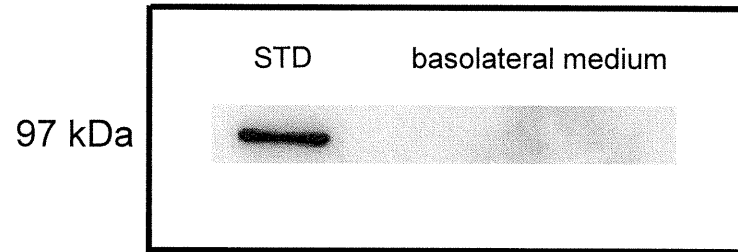


B.

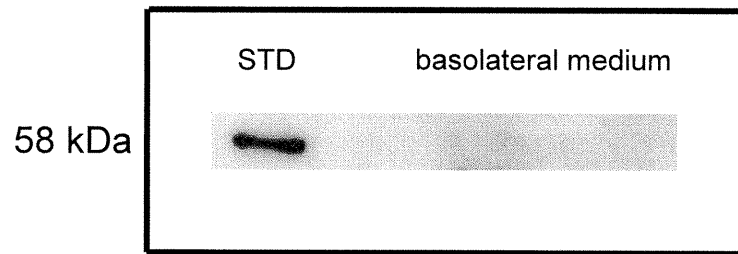


A.

Figure 14

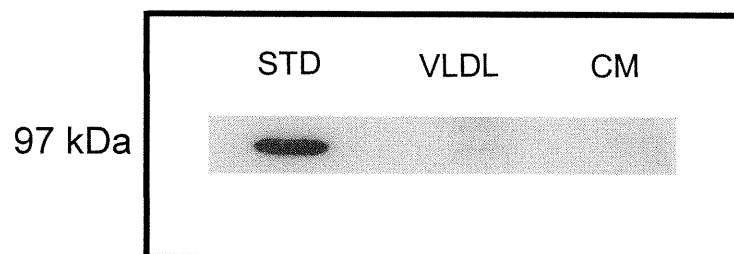


B.

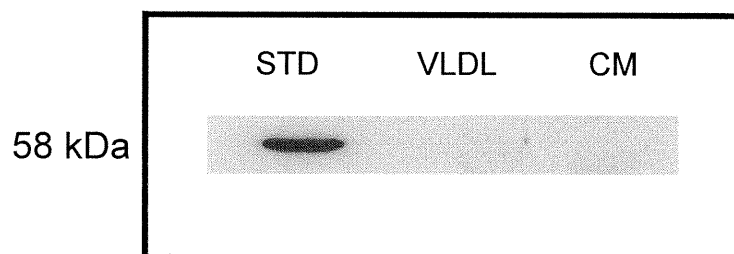


A.

Figure 15



B.



Chapitre 3 : Discussion

L'ensemble des travaux entrepris en vue d'élucider le rôle majeur du complexe MTP dans la formation des lipoprotéines a permis de présumer qu'en vertu de la localisation tissulaire (microsomes isolés de foie et d'intestin bovin) du MTP et de ses propriétés de transport lipidique, le RE constitue son principal site d'action (70). Bien que plusieurs organelles interviennent dans la voie de synthèse et d'excrétion des lipoprotéines intestinales, la présence du complexe MTP-PDI dans des compartiments subcellulaires autres que le RE n'a pas été envisagée. Un des objectifs majeurs de cette étude consiste à établir la distribution du MTP et du PDI au niveau des entérocytes. L'analyse ultrastructurale, obtenue par microscopie électronique, révèle clairement la présence du complexe MTP-PDI dans le RE, l'appareil de Golgi, les microvillosités et la membrane basolatérale. De plus, la co-localisation des deux sous-unités, démontrant le lien étroit existant entre elles, a été notée dans chacun de ces compartiments. L'examen biochimique a, non seulement confirmé ces observations morphologiques, mais a également 1) mis en évidence l'association entre la large sous-unité du MTP et le PDI dans le Golgi; 2) démontré la préservation de son activité de transfert dans le Golgi et la membrane apicale; et 3) identifié la présence de l'apo B dans le Golgi et son interaction avec le MTP. Ces observations suggèrent que le Golgi constitue, comme le RE, une organelle impliquée dans l'assemblage des lipoprotéines riches en apo B. De plus, il semble que le rôle du MTP ne se limiterait pas exclusivement à l'assemblage des lipoprotéines, mais à d'autres fonctions spécifiques aux compartiments où il se distribue, particulièrement au niveau de la membrane apicale et basolatérale.

Présence du complexe MTP-PDI au niveau de l'appareil de Golgi

Le processus d'assemblage des lipoprotéines s'effectue en plusieurs étapes dans lesquelles une interaction étroite entre l'apo B, les lipides et le MTP peut être observée. Une hypothèse selon laquelle la lipidation de l'apo B s'accomplirait en deux étapes distinctes a été proposée. Selon cette supposition, la stabilisation de l'apo B est initiée par la formation d'un cœur lipidique neutre, lequel assure le repliement adéquat de l'apolipoprotéine et sa protection contre la dégradation protéolytique. Le transfert d'une masse de triglycérides à l'apo B, menant à la production d'une particule de VLDL mature, caractérise le second stade de

lipidation. Cependant, la séquence précise dans laquelle le MTP est impliquée ainsi que la façon et le site où l'ajout du cœur lipidique neutre prend place demeurent encore incertains (111,16). Plusieurs modèles ont été élaborés quant à la façon dont les lipoprotéines sont produites: 1) assemblage complet dans le RE (2,98); 2) ancrage de l'apo B dans les membranes jusqu'à l'atteinte du Golgi où le cœur lipidique s'ajouterait à la particule native (8,9); ou 3) addition continue de lipides à l'apo B durant son passage du RE au Golgi (17,58). En supposant que la formation de la lipoprotéine se produise partiellement dans le Golgi où une masse de lipides et des phospholipides y sont ajoutés, il semble raisonnable d'assumer que le MTP réside dans ce compartiment. Nos résultats montrent justement que le MTP est localisé dans l'appareil de Golgi sous sa forme active et interagit avec l'apo B associée à la membrane de l'organelle, tel que Wu et al. (133) ainsi que par Patel et Grundy l'on démontré dans le RE (90).

Les éléments participant à la formation des lipoprotéines ont été bien identifiés et caractérisés dans le RE. D'une part, il est bien connu que la synthèse de l'apo B requiert la machinerie du RE pour acquérir une structure et une conformation adéquate à son incorporation en une particule de lipoprotéine native. En l'occurrence, l'atteinte d'une telle maturité nécessite la présence du complexe MTP-PDI qui participe à sa progression dans la voie d'assemblage des lipoprotéines (90). Par ailleurs, la lipidation de l'apo B, attribuable à l'activité de transfert des lipides du MTP, est médiée via une interaction physique entre ces deux protéines. Plusieurs travaux ont d'ailleurs identifié leur site de liaison (52,6,76). Cette interdépendance entre le MTP et l'apo B, laquelle empêche la dégradation de l'apo B et facilite sa translocation à travers la membrane du RE, pourrait aussi indiquer une activité chaperon du MTP dans le repliement, l'assemblage et la sécrétion de l'apo B. D'autre part, l'association étroite observée entre le PDI et la large sous-unité du MTP est essentielle à la préservation d'une conformation soluble et active du complexe protéique (124,127,130). Étant donné la présence du MTP et son interaction avec le PDI et l'apo B dans le Golgi, il serait raisonnable d'avancer que cette organelle participe activement à la biogenèse des lipoprotéines intestinales.

En tenant compte de nos données ultrastructurelles et biochimiques, quelle serait l'hypothèse la plus valable quant au processus de lipodation de l'apo B en deux phases distinctes? À quelle étape le Golgi intervient-il? Plusieurs études soutiennent l'hypothèse d'un rôle clef de l'appareil de Golgi dans l'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides et dans l'acquisition de phospholipides (48,87). Hussain et al. ont suggéré que l'ajout de gouttelettes lipidiques à la particule de dimension similaire à celle d'une HDL ayant pris naissance dans le RE, prenne place à la jonction du RER et du REL (50). D'un autre côté, en plus d'avoir observé la localisation du complexe MTP-PDI dans le Golgi sous sa forme active, l'évidence d'une étroite association entre le MTP et l'apo B a été notée. En regard de ces observations, il semble rationnel de stipuler que le Golgi constitue un compartiment additionnel où le MTP, par l'addition d'un cœur lipidique neutre, permette à l'apo B d'atteindre une conformation favorisant sa sécrétion. L'origine de cette masse lipidique pourrait provenir soit de la membrane du Golgi ou encore de gouttelettes lipidiques préformées (14). Quelque soit le cas, le MTP permet la fusion de cette masse lipidique à la particule lipoprotéïnémique native où l'apo B y est incorporée. Ce postulat corrobore certaines observations relatives : 1) au marquage radioactif intensif de l'apo B dans la membrane du Golgi (44,45); 2) à la dégradation de l'apo B au niveau du Golgi; et 3) au délai du retrait de l'apo B lié à la membrane du Golgi suivant l'inhibition du MTP par le BMS-200150 (44). De toute évidence, la validité de ces expérimentations repose sur la pureté du compartiment à l'étude. La quantification de marqueurs enzymatiques ainsi que les études immunocytochimiques ont permis de confirmer que l'obtention de nos résultats n'est pas due à une contamination des membranes du Golgi avec des microsomes ou à une fuite du MTP, du RE vers le Golgi.

Quoique qu'il n'existe aucune preuve directe confirmant la fonction du Golgi dans le processus d'assemblage des lipoprotéines, des travaux antécédents ont suggéré l'implication de cette organelle dans la formation de ces véhicules lipidiques. Entre autre, l'association d'environ 50 % de l'apo B à la membrane du RE et du Golgi a été reportée par Bamberger et Lane (8,9). Des observations similaires ont été notées par Higgins qui a proposé que l'un des principaux sites responsables de l'assemblage de l'apo B avec les triglycérides et les phospholipides est la région du trans-Golgi (48). De plus, nos résultats ont révélé que le retrait de l'apo B

nouvellement synthétisée des membranes du RE et du Golgi, mais non de la portion luminale de ces compartiments, est freiné suite à l'inactivation du MTP par son inhibiteur, le BMS-200150. Hebbachi et collaborateurs ont d'ailleurs confirmé ces données au niveau du foie (44,45). La conclusion pouvant être tirée de ces observations est que l'association de l'apo B avec les lipides semble nécessiter la présence du MTP, autant au niveau du RE que du Golgi, afin de permettre l'incorporation de l'apo B dans les chylomicrons produits par l'entérocyte.

Présence du complexe MTP-PDI au niveau de la membrane basolatérale

Une fois la synthèse des chylomicrons et des VLDL complétée via leur passage à travers le RE et le Golgi, ils cheminent jusqu'au dernier compartiment subcellulaire de la voie sécrétoire des lipoprotéines, soit la membrane basolatérale. Les vésicules transportant ces véhicules lipidiques doivent ainsi se fusionner à cette membrane avant de pouvoir en déverser leur contenu dans la circulation sanguine (109). Puisque notre étude ultrastructurale nous démontre la présence du MTP et du PDI au niveau de la membrane basolatérale, serait-il possible que le MTP accompagne les lipoprotéines jusqu'à ce compartiment ou est-ce qu'il reste lié à la lipoprotéine pour être excrété hors de l'entérocyte? L'immunobuvardage effectué sur des chylomicrons et des VLDL isolés à partir de plasma sanguin montre l'absence d'un signal pour l'hétérodimère dans chacune de ces lipoprotéines indiquant que le MTP ne reste pas lié à la lipoprotéine lors de son exocytose vers la circulation sanguine. Ces observations laissent entrevoir que le complexe MTP accompagnerait la lipoprotéine jusqu'à la membrane basolatérale où il y resterait fixé, comme en témoigne les résultats de l'étude morphologique. Bien que cet examen ultrastructurel démontre que les deux sous-unités du complexe MTP se distribuent à proximité l'une de l'autre au niveau de la membrane basolatérale, il nous est impossible de confirmer à cet instant si l'hétérodimère est actif dans ce compartiment. L'hypothèse suggérant que le complexe protéique joue un rôle non seulement dans l'assemblage des lipoprotéines riches en triglycérides, mais également en tant que chaperon facilitant ainsi la sécrétion des chylomicrons et des VLDL, demeure encore infondée. Des études supplémentaires s'avèrent également nécessaires afin de préciser ce qui advient du MTP une fois que la lipoprotéine à atteint sa destination finale.

Présence du complexe MTP-PDI au niveau de la membrane apicale

Outre le RE, le Golgi et la membrane basolatérale, les résultats de notre étude démontrent clairement que l'hétérodimère n'est pas exclusivement confiné dans ces compartiments, mais se distribue également à la membrane apicale de l'intestin. Ce site est caractérisé par la présence de microvillosités, lesquelles favorisent considérablement l'absorption des nutriments. Ces structures s'observent majoritairement dans le système digestif des organismes évolués tels que les mammifères (75). Considérant la localisation du MTP au niveau de la bordure en brosse, la conservation de son expression à travers différentes classes de mammifères peut être envisagée. Une analyse par Western blot des membranes apicales isolées de différentes espèces animales telles que le rat, le chien, le porc et le lapin ainsi que l'humain, confirme la présence du complexe MTP-PDI dans ce compartiment. De plus, l'observation d'une activité de transfert appréciable du MTP est notée dans les microvillosités isolées de chacune des espèces à l'étude. Bien que le type d'alimentation de ces modèles soit très diversifié, l'activité catalytique de l'hétérodimère ne se limite pas qu'aux classes de mammifères supérieures comme en témoignent ces analyses. L'ampleur de l'implication du MTP est possiblement différente dans chacun des cas. Possiblement, sa fonction s'est ajustée au cours de l'évolution, en fonction des apports nutritionnels, particulièrement des lipides, de l'animal. Ce concept mérite d'être examiné dans des travaux futurs.

Généralement, les protéines ciblées au pôle apical sont synthétisées dans le RE, subissent certaines modifications biochimiques dans le Golgi et sont relarguées à la membrane basolatérale avant d'atteindre la bordure en brosse (99). Les résultats obtenus en immunocytochimie démontrent visiblement que le marquage de la large sous-unité du MTP et du PDI au niveau de la membrane apicale domine celui noté pour la membrane basolatérale. En supposant que le MTP et le PDI sont des protéines de la bordure en brosse, il semble intéressant d'explorer si la route qu'elles empruntent et la façon de le faire est la même que celle des autres protéines qui caractérisent la microvillosité. Puisque les résultats de l'étude morphologique, obtenus par microscopie électronique, révèlent la présence du MTP et du PDI dans les mêmes compartiments que ceux impliqués dans la voie de triage des protéines plasmatiques, il est tentant d'affirmer que ces résultats constituent

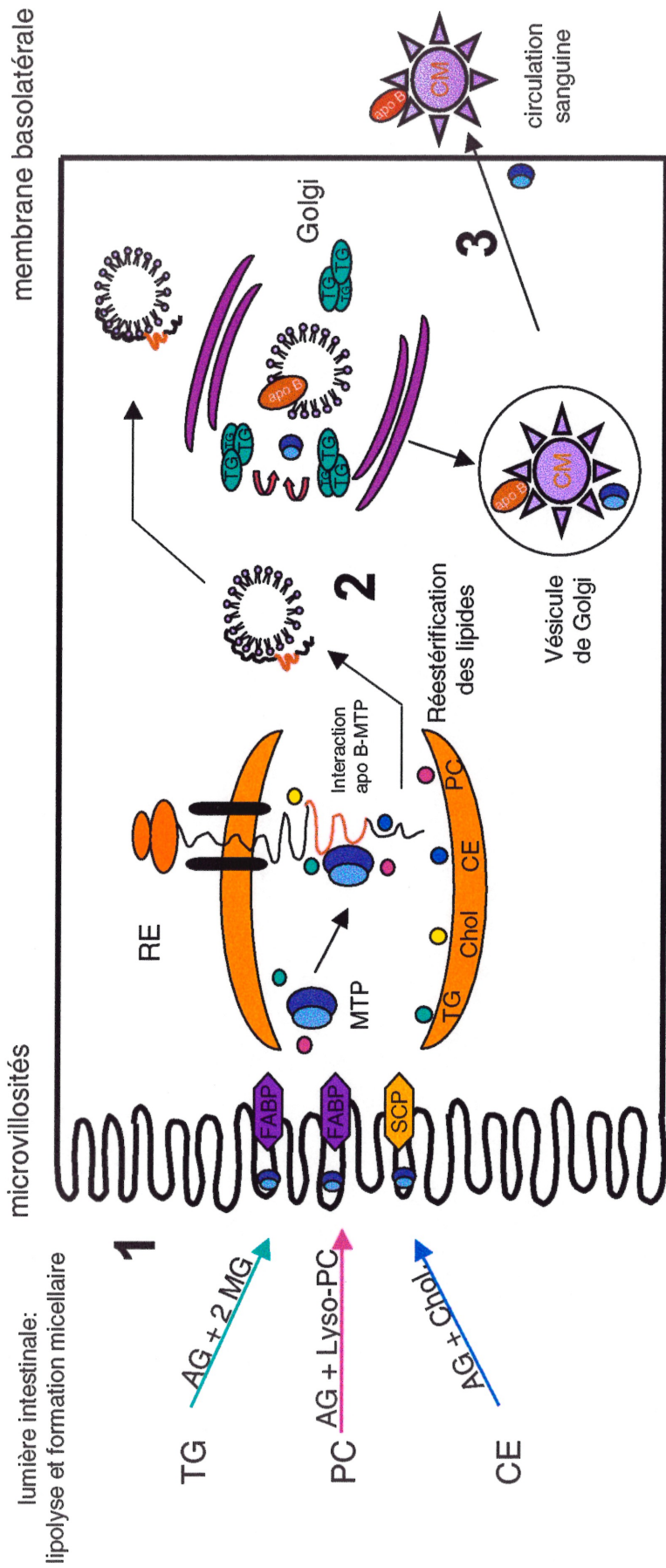
une preuve compatible avec le modèle proposé précédemment. Or, une telle affirmation pourrait s'avérer injustifiée puisqu'il existe d'autres voies intracellulaires dictant le trafic des protéines intestinales. La voie de transcytose impliquant le transport des protéines du compartiment basolatéral vers le pôle apical via les endosomes précoces et le passage direct des protéines à la membrane apicale à partir du réseau Golgien sont d'autres mécanismes potentiels de transport à être considérés. (43).

De toute évidence, le cytosquelette participe activement dans le trafic membranaire puisque les vésicules transportant les protéines ne peuvent atteindre le compartiment cible de façon aléatoire. Effectivement, le cytosquelette est indispensable au trafic ou au triage intracellulaire si l'on considère qu'il 1) fournit un réseau sur lequel les vésicules se déplacent vers une localisation intracellulaire spécifique; 2) procure un transport efficace en maintenant la structure de l'organelle; 3) participe activement et sélectivement au bourgeonnement et /ou à la fusion membranaire; et 4) permet la rétention de certaines protéines au niveau de domaines membranaires spécifiques (61). Afin de vérifier si le cytosquelette est impliqué dans le processus de transport du MTP et du PDI à la membrane apicale, nous avons utilisé des agents capables d'affecter les microtubules, lesquels composent majoritairement le cytosquelette (30,55). L'addition de la colchicine et du nocodazole ont réduit l'expression du MTP au niveau de la bordure en brosse suggérant que le trafic intracellulaire du complexe MTP nécessite un réseau microtubulaire intact. D'autres travaux ont souligné l'inhibition de la voie de transport intracellulaire directe, Golgi-microvillosités, par la dépolymérisation des microtubules du cytosquelette (43). Basé sur ces données, il est possible de proposer que les microtubules constituent une voie de transport des vésicules contenant le MTP, du réseau trans-Golgien vers la membrane apicale et le long de la voie de transcytose.

L'ensemble des résultats obtenus au niveau de la bordure en brosse permet de considérer que le complexe MTP assume une fonction précise dans ce compartiment. Il est bien documenté que le MTP transporte les lipides entre les membranes par un mécanisme de navette de lipides (ping-pong bi-bi) (4). Selon ce mécanisme de navette, la protéine de transfert se lie à une membrane donneuse et en extrait les lipides. Elle s'en dissocie et diffuse vers une seconde membrane où elle se lie et y relâche les lipides extraits (4). Certaines protéines de la membrane plasmique sont connues pour effectuer un travail similaire. En effet, elles interviennent dans le mouvement des phospholipides qui sont synthétisés au niveau du RE et sont déposés dans le feuillet cytoplasmique des membranes biologiques (79). Ces lipides doivent cependant être transférés à travers la bicouche afin d'alimenter le feuillet extracellulaire servant au maintien de l'équilibre de la membrane. Ce transfert à travers la bicouche ne se fait pas de façon spontanée; se sont des protéines spécifiques de la membrane, connues sous le nom de flippases, qui sont responsables du flip flop des phospholipides d'un feuillet à l'autre de la bicouche phospholipidique (25). Considérant que le MTP possède la capacité d'interagir avec les surfaces membranaires et qu'il constitue une protéine de transfert des lipides, serait-il possible que le MTP imite les flippases responsables du flip flop des phospholipides endogènes et /ou exogènes lors de la croissance de la bicouche du compartiment apical? Les événements physiologiques spécifiques dans lesquels le MTP est impliqué demeurent inconnues. De futures expérimentations sont indispensables à la résolution de cette énigme.

En somme, cette étude a permis de démontrer pour la première fois que le complexe MTP n'est pas exclusivement confiné au niveau du RE, mais également au niveau de l'appareil de Golgi, de la membrane basolatérale ainsi que de la bordure en brosse. De plus, la co-localisation du MTP et du PDI, observée dans chacun de ces compartiments, suggère que la protéine de transfert y est active. L'association de ces deux sous-unités indique qu'il existe un contact spatial étroit ou une coopération entre elles, qui s'avère essentiel à la préservation de la forme catalytique active du complexe protéique. Quoique le MTP soit actif dans chacun des compartiments à l'étude, la fonction qu'il accomplit est probablement spécifique au compartiment où il se distribue. Par conséquent, qu'il s'agisse de transfert des lipides entre les membranes, de processus de protection pour les lipoprotéines, ou

d'une fonction structurale d'élaboration et d'équilibre de la bicouche membranaire apicale, le rôle du MTP ne semble plus limité juste à l'assemblage et au transport des lipoprotéines intestinales (figure 11).



1. Microvillosités: Le MTP permettrait le transport des lipides nouvellement absorbés des microvillosités vers un second transporteur intracellulaire spécifique.

2. RE et Golgi: Le MTP contribue à l'assemblage des lipoprotéines en transférant les lipides autour de l'apo B-48, ce qui empêche sa dégradation et lui permet d'être complètement transloquée dans la lumière du RE, où la synthèse des lipoprotéines se poursuit et ce, jusque dans le Golgi.

3. Membrane basolatérale: Le MTP joue un rôle de chaperon en dirigeant les lipoprotéines vers la membrane basolatérale où elles sont majoritairement excrétées.

Figure 11. Rôles possibles du complexe MTP-PDI dans l'entérocyte.

Bibliographie

1. Aguie, G.A., Rader, D.J., Clavey, V., Traber, M.G., Torpier, G., Kayden, H.J., Fruchart, J.C., Brewer, H.B.Jr, and, Castro, G. (1995) Lipoproteins containing apolipoprotein B isolated from patients with abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia : identification and characterization. *Atherosclerosis*, **118** (2):183-191.
2. Alexander, C.A., Hamilton, R.L., and Havel, R.J. (1976) Subcellular localization of B apoprotein of plasma lipoproteins in rat liver. *J. Cell. Biol.*, **69**:241-263.
3. Anderson, T.A., Levitt, D.G., and Banaszak, L.J. (1998) The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein. *Structure*, **6**:895-909.
4. Atzel, A., and Wetterau, J.R. (1993) Mechanism of microsomal triglyceride transfer protein catalyzed lipid transport. *Biochemistry*, **32** :10444-10450.
5. Atzel, A., and Wetterau, J.R. (1994) Identification of two classes of lipid molecule binding sites on the microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemistry*, **33** : 15382-15388.
6. Bakillah, A., Jamil, H., and Hussain, M.M. (1998) Lysine and arginine residues in the N-terminal 18% of apolipoprotein B are critical for its binding to microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemistry*, **37**: 3727-34.
7. Bakillah, A., and Hussain, M.M. (2001) Binding of microsomal triglyceride transfer protein to lipids results in increased affinity for apolipoprotein B. Evidence for stable microsomal MTP-lipid complexes. *J. Biol. Chem.*, **276** (33):31466-31473.
8. Bamberger, M.J., and Lane, M.D. (1988) Assembly of very low density lipoprotein in the hepatocytes. Differential transport of apoproteins through the secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, **263** (24) :11868-11878.

9. Bamberger, M.J., and Lane, M.D. (1990) Possible role of the Golgi apparatus in the assembly of very low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87** (7) :2390-2394.
10. Bennett, A.J., Billett, M.A., Salter, A.M., Mangiapane, E.H., Bruce, J.S., Anderto, K.L., Marenah, C.B., Lawson, N., and White, D.A. (1995) Modulation of hepatic apolipoprotein B, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and low-density lipoprotein receptor mRNA and plasma lipoprotein concentrations by defined dietary fats. Comparison of trimyristin, tripalmitin, tristearin and triolein. *Biochem J.*, **311** (Pt1) :167-173.
11. Bennett, A.J., Billett, M.A., Salter, A.M., and White, D.A. (1995) Regulation of hamster hepatic microsomal triglyceride transfer protein mRNA levels by dietary fats. *Biochem Biophys Res Commun.*, **212** (2) : 473-478.
12. Bennett, A.J., Bruce, J.S., Salter, A.M., White, D.A., and Billett, M.A. (1996) Hepatic microsomal triglyceride transfer protein messenger RNA concentrations are increased by dietary cholesterol in hamsters. *FEBS Lett.*, **394** :247-250.
13. Benoist, F., and Grand-Perret, T. (1997) Co-translational degradation of apolipoprotein B100 by the proteasome is prevented by microsomal triglyceride transfer protein. Synchronized translation studies on HepG2 cells treated with an inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein. *J. Biol. Chem.*, **272** :20435-20442.
14. Berriot-Varoqueaux, N., Aggerbeck, L.O., Samson-Bouma, M.-E., and Wetterau, J.R. (2000) The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu. Rev. Nutr.*, **20**:663-697.
15. Borén, J., Graham, L., Wettsten, M., Scott, J., White, A., and Olofsson, S.-O. (1992) The assembly and secretion of apoB 100-containing lipoproteins in HepG2 cells. ApoB 100 is cotranslationally integrated into lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, **267** (14) : 9858-9867.
16. Borén, J., Rustaeus, S., and Olofsson, S.-O. (1994) Studies on the assembly of apolipoprotein B-100 and B-48-containing very low density lipoproteins in McA-RH7777 cells. *J. Biol. Chem.*, **269** (41) :25879-25888.

17. Bostrom, K., Wettsten, M., Borén, J., Bondjers, G., Wiklund, O., and Olofsson, S.-O. (1987) Studies on the assembly of apo B-100-containing lipoproteins in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.*, **263** (9) :4434-4442.
18. Bradbury, P., Mann, C.J., Köchl, S., Anderson, T.A., Chester, S.A., Hancock, J.M., Ritchie, P.J., Amey, J., Harrison, G.B., Levitt, D.G., Banaszak, L.J., Scott, J., and Shoulders, C.C. (1999) A common binding site on the microsomal triglyceride transfer protein for apolipoprotein B and protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.*, **274**(5) :3159-3164.
19. Brett, D.J., Pease, R.J., Scott, J., and Gibbons, G.F. (1995) Microsomal triglyceride transfer protein activity remains unchanged in rat livers under conditions of altered very-low-density lipoprotein secretion. *Biochem. J.*, **310** :11-14.
20. Campbell, N.A. (1995) *Biologie*. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Québec.
21. Cartwright, I.J., and Higgins, J.A. (1996) Intracellular degradation in the regulation of secretion of apo B-100 by rabbit hepatocytes. *Biochem J.*, **314** :377-384.
22. Caspary, W.F. (1992) Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr*, **55** :299S-308S.
23. Chang, B.H.-J., Liao, W., Li, L., Nakamuta, M., Mack, D., and Chan, L. (1999) Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse. *J. Biol. Chem.*, **274** (10) :6051-6055.
24. Couture, P., Otvos, J.D., Cupples, L.A., Wilson, P.W.F., Schaefer, E.J., and Ordovas, J.M. (2000) Absence of association between genetic variation in the promoter of the microsomal triglyceride transfer protein gene and plasma lipoproteins in the Framingham Offspring study. *Atherosclerosis*, **148** : 337-343.
25. Daleka, D.L., and Lyles, J.V. (2000) Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta*, **1486**: 108-127.

26. Dashti, N., Williams, D.L., and Aplaupovic, P. (1989) Effects of oleate and insulin on the production rates and cellular mRNA concentrations of apolipoproteins in HepG2 cells. *J. Lipid Res.*, **30**:1365-1373.
27. Dashti, N., Franklin, F.A., and Abrahamson, D.R. (1996) Effect of ethanol on the synthesis and secretion of apoA-1- and apoB-containing lipoproteins in HepG2 cells. *J. Lipid Res.*, **37**:810-824.
28. Davidson, N.O. (1994) Cellular and molecular mechanisms of small intestinal lipid transport. *Dans Physiology of the Gastrointestinal tract*. Third Edition. Raven Press, New york, pp. 1909-1929.
29. Davidson, N.O., and Magun, A.M. (1995) Intestinal lipid absorption. *Dans Textbook of Gastroenterology*. Second edition. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, pp. 428-449.
30. Downing, K.H. (2000) Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **16** :89-111.
31. Du, E.Z., Kurth, J., Wang, S.-L., Humiston, P., and Davis, R.A. (1994) Proteolysis-coupled secretion of the N terminus of the apolipoprotein B. Characterization of a transient, translocation arrested intermediate. *J. Biol. Chem.*, **269** (39) :24169-24176.
32. Du, E.Z., Wang, S.-L., Kayden, H.J., Sokol, R., Curtiss, L.k., and Davis, R.A. (1996) Translocation of apolipoprotein B across the endoplasmic reticulum is blocked in abetalipoproteinemia. *J. Lipid Res.*, **37** :1309-1315.
33. Dupont, A.G., De Cree, J., Vermeulen, R., Salvo, W., and Deridder, F. (1999) Clinical experience with R103757, a potent inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Atherosclerosis*, **144** (suppl.1) :39.
34. Fisher, E.A., Zhou, M., Mitchell, D.M., Wu, X., Omura, S., Wang, H., Goldberg, A.L., Ginsberg, H.N. (1997) The degradation of apolipoprotein B-100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.*, **272** (33) :20427-20434.

35. Gleeson, A., Anderton, K., Owens, D., Bennett, A., Collins, P., Johnson, A., White, D., and Tomkin, G.H. (1999) The role of microsomal triglyceride transfer protein and dietary cholesterol in chylomicron production in diabetes. *Diabetologia*, **42** : 944-948.
36. Gordon, D.A., Jamil, H., Sharp, D., Mullaney, D., Yao, Z., Gregg, R.E., and Wetterau, J. (1994) Secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HeLa cells is dependent on expression of the microsomal triglyceride transfer protein and is regulated by lipid availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** :7628-7632.
37. Gordon, D.A., Jamil, H., Gregg, R.E., Olofsson, S.-O., and Borén J. (1996) Inhibition of the microsomal triglyceride transfer protein blocks the first step of apolipoprotein B lipoprotein assembly but not the addition of bulk core lipids in the second step. *J. Biol. Chem.*, **271** (51) :33047-33053.
38. Gordon, D.A., and Jamil, H. (2000) Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, **1486** :72-83.
39. Gotto, A., and Pownall, H. (1999) *Manual of lipid disorders : reducing the risk for coronary heart disease*. Second Edition. Williams&Wilkins, Baltimore, p. 6.
40. Gretch, D.G., Sturley, S.L., Wang, L., Lipton, B.A., Dunning, A., Grunwald, K.A.A., Wetterau, J.R., Yao, Z., Talmud, P., and Attie, A.D. (1996) The amino terminus of apolipoprotein B is necessary but not sufficient for microsomal triglyceride transfer protein responsiveness. *J. Biol. Chem.*, **271** (15): 8682-8691.
41. Grundy, S.M. (1990) *Cholesterol and atherosclerosis : diagnosis and treatment*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, p. 1.9.
42. Hagan, D.L., Kienzle, B., Jamil, H., and Hariharan, N. (1994) Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. Cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J. Biol. Chem.*, **269**(46) :28737-28744.
43. Hauri, H.P., and Matter, K. (1991) Protein traffic in intestinal epithelial cells. *Semin Cell Biol.*, **2** (6) :355-364.

44. Hebbachi, A.-M., Brown, A.-M., and Gibbons, G.F. (1999) Suppression of cytosolic triacylglycerol recruitment for very low density lipoprotein assembly by inactivation of microsomal triglyceride transfer protein results in a delayed removal of apo B-48 and apo B-100 from microsomal and Golgi membranes of primary hepatocytes. *J. Lipid Res.*, **40** :1758-1768.
45. Hebbachi, A.-M., and Gibbons, G.F. (1999) Inactivation of microsomal triglyceride transfer protein impairs the normal redistribution but not the turnover of newly synthesized glycerolipid in the cytosol, endoplasmic reticulum and Golgi of primary hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1441** (1) :36-50.
46. Herrmann, S.-M., Poirier, O., Nicaud, V., Evans, A., Ruidavets, J.-B., Luc, G., Arveiller, D., Ba0-Sheng, C., and Cambien, F. (1998) Identification of two polymorphisms in the promoter of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene : lack of association with lipoprotein profiles. *J. Lipid Res.*, **39** :2432-2435.
47. Herscovitz, H., Kritis, A., Talianidis, I., Zanni, E., Zannis, V., and Small, D.M. (1995) Murine mammary-derived cells secrete the N-terminal 41% of human apolipoprotein B on high density lipoprotein-sized lipoproteins containing a triacylglycerol-rich core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92** :659-663.
48. Higgins, J.A. (1988) Evidence that during very low density lipoprotein assembly in rat hepatocytes most of the triacylglycerol and phospholipids are packaged with apolipoprotein B in the Golgi complex. *FEBS Lett.*, **232** (2) :405-408.
49. Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.P., and Scrimgeour, K.G. (1994) *Principes de Biochimie*. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles.
50. Hussain, M.M., Kanchar, R.K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H., and Bakillah, A. (1996) Chylomicron assembly and catabolism : role of apolipoproteins and receptors. *Biochim. Biophys. Acta*, **1300** :151-170.
51. Hussain, M.M., Bakillah, A., and Jamil, H. (1997) Apolipoprotein B binding to microsomal triglyceride transfer protein decreases with length and lipidation : implications in lipoprotein biosynthesis. *Biochemistry*, **36** :13060-13067.

52. Hussain, M.M., Bakillah, A., Nayak, N., and Shelness, G.S. (1998) Amino acids 430-570 in apolipoprotein B are critical for its binding to microsomal triglyceride transfer protein. *J. Biol. Chem.*, **273** (40) :25612-25615.
53. Ingram, M.F., and Shelness, G.S. (1997) Folding of the amino-terminal domain of apolipoprotein B initiates microsomal triglyceride transfer protein-independent lipid transfer to nascent very low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, **272** (15) :10279-10286.
54. Ivessa, N.E., Rehberg, E., Kienzle, B., Seif, F., Recheis, B., Hermann, M., Schneider, W.J., and Gordon, D.A. (1996) Cloning and expression of the chicken microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Mol. Biol. Cell*, **7** :776 (abstr.).
55. Iwasaki, S. (1998) Natural organic compounds that affect to microtubule functions. *Yakugaku Zasshi*, **118** (4) :112-126.
56. Jamil, H., Dickson, J.K.Jr., Chu, C.-H., Lago, M.W., Rinehart, J.K., Biller, S.A., Gregg, R.E., and Wetterau, J.R. (1995) Microsomal triglyceride transfer protein. Specificity of lipid binding and transport. *J. Biol. Chem*, **270** (12) :6549-6554.
57. Jamil, H., Gordon, D.A., Eustice, D.C., Brooks, C.M., Dickson, J.K., Chen, Jr. Y., Ricci, B., Chu, C.-H., Harrity, T.W., Ciosek, C.P., Biller, Jr.S.A., Gregg, R.E., and Wetterau, J.R. (1996) An inhibitor of the microsomal triglyceride transfer protein inhibits apoB secretion from HepG2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** : 11991-11995.
58. Janero, D.R., and Lane, M.D. (1983) Sequential assembly of very low density lipoprotein apolipoproteins, triacylglycerol, and phosphoglycerides by the intact liver cell. *J. Biol. Chem.*, **258** (23) :14496-14504.
59. Juo, S.-H.H., Han, Z., Smith, J.D., Colangelo, L., and Liu, K. (2000) Common polymorphism in promoter of microsomal triglyceride transfer protein gene influences cholesterol, apoB, and triglyceride levels in young african american men. Results from the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **20** :1316-1322.

60. Karpe, F., Lundahl, B., Ehrenborg, E., Eriksson, P., Hamsten, A. (1998) A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **18** :756-761.
61. Kelly, R.B. (1990) Microtubules, membrane traffic, and cell organization. *Cell.*, **61** (1) :5-7.
62. Koivunen, P., Horelli-Kuitunen, N., Helaakoski, T., Karvonen, P., Jaakkola, M., Palotie, A., and Kivirikko, K.I. (1997) Structures of the human gene for the protein disulfide isomerase-related polypeptide Erp60 and a processed gene and assignment of these genes to 15q15 and 1q21. *Genomics*, **42** :397-404.
63. Kosykh, V.A., Surguchov, A.P., Podres, E.A., Novikov, D.K., Sudarichov, A.B., Berestetskaya, YuV, Repin, V.S., Smirnov, V.N. (1988) VLDL apoprotein secretion and apo-B mRNA level in primary culture of cholesterol-loaded rabbit hepatocytes. *FEBS Lett.*, **232** (1) :103-106.
64. Lamberg, A., Jauhianen, M., Metso, J., Ehnholm, C., Shoulders, C., Scott, J., Pihlajaniemi, T., and Kivirikko, K.I. (1996) The role of protein disulphide isomerase in the microsomal triacylglycerol transfer protein does not reside in its isomerase activity. *Biochem. J.*, **315** :533-536.
65. Leiper, J.M., Bayliss, J.D., Pease, R.J., Brett, D.J., Scott, J., and Shoulders, C.C. (1994) Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. *J. Biol. Chem.*, **269** (35) :21951-21954.
66. Levy, E., Chouraqui, J.-P., and Roy, C.C. (1988) Steatorrhea and disorders of chylomicron synthesis and secretion. *Pediatric Clinics of North America*, **35** (1) : 53-67.
67. Levy, E., and Roy, C.C. (1989) Developmental aspects of intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Dans Human Gastrointestinal Development*. Raven Press, New York, pp. 491-502.
68. Levy, E. (1996) The genetic basis of primary disorders of intestinal fat transport. *Clin Invest Med*, **19** (5) : 317-324.

69. Liang, J.-S., Wu, X., Fisher, E.A., and Ginsberg, H.N. (2000) The amino-terminal domain of apolipoprotein B does not undergo retrograde translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J. Biol. Chem.*, **275** (41) :32003-32010.
70. Liang, J.-S., and Ginsberg, H.N. (2001) Microsomal triglyceride transfer protein binding and lipid transfer activities are independent of each other, but both are required for secretion of apolipoprotein B lipoproteins from liver cells. *J. Biol. Chem.*, **276**(30):28606-28612.
71. Lin, M.C.M, Arbeeny, C., Bergquist, K., Kienzle, B., Gordon, D.A., and Wetterau, J.R. (1994) Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. The regulation is independent from that of other hepatic and intestinal proteins which participate in the transport of fatty acids and triglycerides. *J. Biol. Chem.*, **269** (46) :29138-29145.
72. Lin, M.C.M., Gordon, D.A., and Wetterau, J.R. (1995) Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells : insulin negatively regulates MTP gene expression. *J. Lipid Res.*, **36** :1073-1081.
73. Lin, M.C.M., Li, J.-J., Wang, E.-J., Princler, G.L., Kauffman, F.C., and Kung, H.-F. (1997) Ethanol down-regulates the transcription of microsomal triglyceride transfer protein gene. *FASEB J.*, **11** :1145-1152.
74. Lundahl, B., Leren, T.P., Ose, L., Hamsten, A., and Karpe, F. (2000) A functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP -493G/T) influences lipoprotein phenotype in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **20** :1784-1788.
75. Madara, J.L., and Trier, J.S. (1994) The functional morphology of the mucosa of the small intestine. *Dans Physiology of the Gastrointestinal tract*. Third Edition. Raven Press, New york, pp. 1577-1605.
76. Mann, C.J., Anderson, T.A., Read, J., Chester, S.A., Harrison, G.B., Köchl, S., Ritchie, P.J., Bradbury, P., Hussain, F.S., Amey, J., Vanloo, B., Rosseneu Recaredo Infante, M., Hancock, J.M., Levitt, D.G., Banaszak, L.J., Scott, J., and Shoulders, C.C. (1999) The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *J. Mol. Biol.*, **285** :391-408.

77. Marieb, E.N. (1999) Anatomie et physiologie humaines. 2^e édition. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., p. 48.
78. Mathur, S.N., Born, E., Murthy, S., and Field, F.J. (1997) Microsomal triglyceride transfer protein in Caco-2 cells : characterization and regulation. *J. Lipid Res.*, **38** : 61-67.
79. Menon, A.K., Watkins, W.E. 3rd, and Hrafnisdottir, S. (2000) Specific proteins are required to translocate phosphatidylcholine bidirectionally across the endoplasmic reticulum. *Curr Biol.*, **10**: 241-252.
80. Menzel, H.J., Dieplinger, H., Lackner, C., Hoppichler, F., Lloyd, J.K., Muller, D.R., Labeur, C., Talmud, P.J., and Utermann, G. (1990) Abetalipoproteinemia with an apoB-100-lipoprotein(a) glycoprotein complex in plasma. Indication for an assembly defect. *J. Biol. Chem.*, **265** (2) :981-986.
81. Murthy, S., Albright, E., Mathur, S.N., Davidson, N.O., and Field, F.J. (1992) Apolipoprotein B mRNA abundance is decreased by eicosapentaenoic acid in Caco-2 cells. Effect on the synthesis and secretion of apolipoprotein B. *Arterioscler. Thromb.*, **12** (6) :691-700.
82. Nakamuta, M., Chang, B.H.J., Hoogeveen, R., Li, W.H., and Chan, L. (1996) Mouse microsomal triglyceride transfer protein large subunit-cDNA cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization. *Genomics*, **33** :313-316.
83. Narcisi, T.M.E., Shoulders, C.C., Chester, S.A., Read, J., Brett, D.J., Harrison, G.B., Grantham, T.T., Fox, M.F., Povey, S., Bruin, T.W.A., Erkelens, D.W., Muller, D.P.R., Lloyd, J.K., and Scott, J. (1995) Mutations of the microsomal triglyceride transfer-protein gene in abetalipoproteinemia. *Am. J. Hum. Genet.*, **57** :1298-1310.
84. Navasa, M., Gordon, D.A., Hariharan, N., Jamil, H., Shigenaga, J.K., Moser, A., Fiers, W., Pollock, A., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (1998) Regulation of microsomal triglyceride transfer protein mRNA expression by endotoxin and cytokines. *J. Lipid Res.*, **39**: 1220-1230.

85. Noiva, R., Freedman, R.B., and Lennarz, W.J. (1993) Peptide binding to protein disulfide isomerase occurs at a site distinct from the active sites. *J. Biol. Chem.*, **268** (26) :19210-19217.
86. Ohashi, K., Ishibashi, S., Osuga, J.-i., Harada, K., Yahagi, N., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Tamura, Y., Nagai, R., Illingworth, D.R., Gotoda, T., and Yamada, N. (2000) Novel mutations in the microsomal triglyceride transfer protein gene causing abetalipoproteinemia. *J. Lipid Res.*, **41** :1199-1204.
87. Olofsson, S.-O., Bjursell, G., Bostrom, K., Carlsson, P., Elovson, J., Protter, A.A., Reuben, M.A., and Bondjers, G. (1987) Apolipoprotein B : structure, biosynthesis and role in the lipoprotein assembly process. *Atherosclerosis*, **68** (1-2) :1-17.
88. Pape, M.E., Castle, C.K., Murray, R.W., Funk, G.M., Hunt, C.E., Marotti, K.R., Melchior, G.W. (1991) Apo B metabolism in the cynomolgus monkey : evidence for post-transcriptional regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1086** (3) :326-334.
89. Pariyarath, R., Wang, H., Aitchison, J.D., Ginsberg, H.N., Welch, W.J., Johnson, A.E., and Fisher, E.A. (2001) Co-translational interactions of apoprotein B with the ribosome and translocon during lipoprotein assembly or targeting to the proteasome. *J. Biol. Chem.*, **276** (1) : 541-550.
90. Patel, S.B., and Grundy, S.M. (1996) Interactions between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B within the endoplasmic reticulum in a heterologous expression system. *J. Biol. Chem.*, **271** (31) :18686-18694.
91. Pease, R.J., Harrison, G.B., and Scott, J. (1991) Cotranslational insertion of apolipoprotein B into the inner leaflet of the endoplasmic reticulum. *Nature*, **353** : 448-450.
92. Pihlajaniemi, T., Helaakoski, T., Tasanen, K., Myllylä, R., Huhtala, M.-L., Koivu, J., and Kivirikko, K.I. (1987) Molecular cloning of the β -subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *EMBO J.*, **6** (3) :643-649.

93. Pullinger, C.R., North, J.D., Teng, B.-B., Rifici, V.A., Ronhild de Brito, A.E., and Scott, J. (1989) The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2 cells: regulation of secretion by oleic acid, albumin, and measurement of the mRNA half-life. *J. Lipid Res.*, **30**:1065-1077.
94. Raabe, M., Véniant, M.M., Sullivan, M.A., Zlot, C.H., Björkegren, J., Nielson, L.B., Wong, J.S., Hamilton, R.L., and Young, S.G. (1999) Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J. Clin. Invest.*, **103** (9) :1287-1298.
95. Read, J., Anderson, T.A., Ritchie, P.J., Vanloo, B., Amey, J., Levitt, D., Rosseneu, M., Scott, J., and Shoulders, C.C. (2000) A mechanism of membrane neutral lipid acquisition by the microsomal triglyceride transfer protein. *J. Biol. Chem.*, **275** (39) : 30372-30377.
96. Rehberg, E.F., Samson-Bouma, M.-E., Kienzle, B., Blinderman, L., Jamil, H., Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., and Gordon, D.A. (1996) A novel abetalipoproteinemia genotype. *J. Biol. Chem.*, **271** (47) :29945-29952.
97. Ricci, B., Sharp, D., O'Rourke, E., Kienzle, B., Blinderman, L., Gordon, D., Smith-Monroy, C., Robinson, G., Gregg, R.E., Rader, D.J., and Wetterau, J.R. (1995) A 30-amino acid truncation of the microsomal triglyceride transfer protein large subunit disrupts its interaction with protein disulfide-isomerase and causes abetalipoproteinemia. *J. Biol. Chem.*, **270** (24) :14281-14285.
98. Rusinol, A., Verkade, H., and Vance, J.E. (1993) Assembly of rat hepatic very low density lipoproteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **268** (5) :3555-3562.
99. Sabatini, D.D., Kreibich, G., Morimoto, T., Adesnik, M. (1982) Mechanism for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *J. Cell Biol.*, **92** (1) :1-22.
100. Sato, R., Miyamoto, W., Inoue, J., Terada, T., Imanaka, T., and Maeda, M. (1999) Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J. Biol. Chem.*, **274** (35) :24714-24720.

101. Sharp, D., Blinderman, L., Combs, K.A., Kienzle, B., Ricci, B., Wager-Smith, K., Gil, C.M., Turck, C.W., Bouma, M.E., Rader, D.J. *et al.* (1993) Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinemia. *Nature*, **365** : 65-69.
102. Sharp, D., Ricci, B., Kienzle, B., Lin, M.C.M., and Wetterau, J.R. (1994) Human microsomal triglyceride transfer protein large subunit gene structure. *Biochemistry*, **33** :9057-61.
103. Shelness, G.S., Ingram, M.F., Huang, X.F., and deLozier, J.A. (1999) Apolipoprotein B in the rough endoplasmic reticulum: translation, translocation and initiation of lipoprotein assembly. *J. Nutr.*, **129** :456S-462S.
104. Shills, M.E., Olson, J.A., Shike, M., and Ross, A.C. (1999) *Modern Nutrition in health and disease*. 9th edition. Williams&Wilkins, Baltimore, p.68.
105. Shimomura, I., Bashmakov, Y., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1997) Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** :12354-12359.
106. Shoulders, C.C., Brett, D.J., Bayliss, J.D., Narcisi, T.M.E., Jarmuz, A. *et al.* (1993) Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum. Mol. Genet.*, **2** :2109-2116.
107. Shoulders, C.C., Narcisi, T.M.E., Read, J., Chester, S.A., Brett, D.J., *et al.* (1994) The abetalipoproteinemia gene is a member of the vitellogenin family and encodes an α -helical domain. *Struct. Biol.* **1** :285-286.
108. Sorci-Thomas, M., Wilson, M.D., Johnson, F.L., Williams, D.L., and Rudel, L.L. (1989) Studies on the expression of genes encoding apolipoproteins B100 and B48 and the low density lipoprotein receptor in nonhuman primates. Comparison of dietary fat and cholesterol. *J. Biol. Chem.*, **264** (15):9039-45.
109. Spring, D.J., Chen-Liu, L.W., Chatterton, J.E., Elovson, J., and Schumaker, V.N. (1992) Lipoprotein assembly. *J. Biol. Chem.*, **267** (21) :14839-14845.

110. Srivastava, R.A., Jiao, S., Tang, J.J., Pflieger, B.A., Kitchens, R.T., and Schonfeld, G. (1991) In vivo regulation of low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein B gene expressions by dietary fat and cholesterol inbred strains of mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **1086** (1) :29-43.
111. Swift, L.L. (1995) Assembly of very low density lipoproteins in rat liver : a study of nascent particles recovered from the rough endoplasmic reticulum. *J. Lipid Res.*, **36** :395-406.
112. Tasanen, K., Oikarinen, J., Kivirikko, K.I., and Pihlajaniemi, T. (1992) Promoter of the gene for the multifunctional protein disulfide isomerase polypeptide. Functional significance of the six CCAAT boxes and other promoter elements. *J. Biol. Chem.*, **267** (16) :11513-11519.
113. Thompson, J., Sack, J., Jamil, H., Wetterau, J., Einspahr, H., and Banaszak, L. (1998) Structure of the microsomal triglyceride transfer protein in complex with protein disulfide isomerase. *Biophys. J.*, **74** (2) : A138 (abstr.).
114. Thorngate, F.E., Raghow, R., Wilcox, H.G., Werner, C.S., Heimberg, M., and Elam, M.B. (1994) Insulin promotes the biosynthesis and secretion of apolipoprotein B-48 by altering apolipoprotein B mRNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 5392-5396.
115. Tortora, G.J., Grabowski, S.R., and Parent, J.-C. (1994) *Principes d'anatomie et de physiologie*. Centre Éducatif et Culturel inc., Québec.
116. Tso, P. (1994) Intestinal lipid absorption. *Dans Physiology of the Gastrointestinal tract*. Third Edition. Raven Press, New York, pp.1867-1901.
117. Veijola, J., Koivunen, P., Annunen, P., Pihlajaniemi, T., and Kivirikko, K.I. (1994) Cloning baculovirus expression, and characterization of the alpha subunit of prolyl 4-hydroxylase from the nematode *Caenorhabditis elegans*. This alpha subunit forms an active beta dimer with the human protein disulfide isomerase / beta subunit. *J. Biol. Chem.*, **269** (43):26746-26753.

118. Vuori, K., Myllylä, R., Pihlajaniemi, T., and Kivirikko, K.I. (1992) Expression and site-directed mutagenesis of human protein disulfide isomerase in *Escherichia coli*. This multifunctional polypeptide has two independently acting catalytic sites for the isomerase activity. *J. Biol. Chem.*, **267** (11) :7211-7214.
119. Wang, T.W.M., Byrne, C.D., and Hales, C.N. (1994) Effect of ethanol on hepatic apolipoprotein B synthesis and secretion in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **1211**: 234-238.
120. Wang, S., Mcleod, R.S., Gordon, D.A., and Yao, Z. (1996) The microsomal triglyceride transfer protein facilitates assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins and decreases cotranslational degradation of apolipoprotein B in transfected COS-7 cells. *J. Biol. Chem.*, **271** (24) :14124-14133.
121. Wang, Y., Mcleod, R.S., Yao, Z. (1997) Normal activity of microsomal triglyceride transfer protein is required for the oleate-induced secretion of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B from McA-RH7777 cells. *J. Biol. Chem.*, **272** (19) :12272-12278.
122. Wang, Y., Tran, K., and Yao, Z. (1999) The activity of microsomal triglyceride transfer protein is essential for accumulation of triglyceride within microsomes in McA-RH7777 cells. A unified model for the assembly of very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, **274** (39) :27793-27800.
123. Wetterau, J.R., and Zilversmit, D.B. (1984) A triglyceride and cholesterol ester transfer protein associated with liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **259** (17) :10863-10866.
124. Wetterau, J.R., and Zilversmit, D.B. (1985) Purification and characterization of microsomal triglyceride and cholesteryl ester transfer protein from bovine liver microsomes. *Chem. Phys. Lipids*, **38** :205-222.
125. Wetterau, J.R., and Zilversmit, D.B. (1986) Localization of intracellular triacylglycerol and cholesteryl ester transfer activity in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **875** :610-617.

126. Wetterau, J.R., Combs, K.A., Spinner, S.N., and Joiner, B.J. (1990) Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J. Biol. Chem.*, **265** (17) : 9800-9807.
127. Wetterau, J.R., Combs, K.A., Mclean, L.R., Spinner, S.N., and Aggerbeck, L.P. (1991) Protein disulfide isomerase appears necessary to maintain the catalytically active structure of the microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemistry*, **30** : 9728-9735.
128. Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Bouma, M.E., Eisenberg, C., Munck, A., Hermier, M., Schmitz, J., Gay, G., Rader, D.J., Gregg, R.E. (1992) Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*, **258** : 999-1001.
129. Wetterau, J.R., and Gregg, R.E. (1995) Microsomal triglyceride transfer protein. Insights into lipoprotein assembly and abetalipoproteinemia. *Atherosclerosis X*. Elsevier Science B.V., pp. 40-44.
130. Wetterau, J.R., Lin, M.C.M, and Jamil, H. (1997) Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1345** :136-150.
131. Wetterau, J.R., Gregg, R.E., Harrity, T.W., Arbeeny, C., Cap, M., Connolly, F., Chu, C.-H., George, R.J., Gordon, D.A., Jamil, H., Jolibois, K.G., Kunselman, L.K., Lan, S.-J., Maccagnan, T.J., Ricci, B., Yan, M., Young, D., Chen, Y., Fryszman, O.M., Logan, V.H., Musial, C.L., Poss, M.A., Robl, J.A., Simpkins, L.M., Slusarchyk, W.A., Sulsky, R., Taunk, P., Magnin, D.R., Tino, J.A., Lawrence, R.M., Dickson, J.K.Jr., Biller, S.A. (1998) An MTP inhibitor that normalizes atherogenic lipoprotein levels in WHHL rabbits. *Science*, **282** :751-754.
132. White, D.A., Bennett, A.J., Billett, M.A., and Salter, A.M. (1998) The assembly of triacylglycerol-rich lipoproteins : an essential role for the microsomal triacylglycerol transfer protein. *Br J Nutr*, **80** :219-229.
133. Wu, X., Zhou, M., Huang, L.-S., Wetterau, J., Ginsberg, H.N. (1996) Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of apoB-containing lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, **271** (17) :10277-10281.

134. Yao, Z., Blackhart, B.D., Linton, M.F., Taylor, S.M., Young, S.G., and McCarthy, B.J. (1991) Expression of carboxyl-terminally truncated forms of human apolipoprotein B in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, **266** (5) :3300-3308.
135. Yeung, S.J., Chen, S.H., and Chan, L. (1996) Ubiquitin-proteasome pathway mediates intracellular degradation of apolipoprotein B. *Biochemistry*, **35** :13843-13848.
136. Yokoyama, K., Ishibashi, T., Yi-qiang, A., Teramoto, T., and Maruyama, Y. (1998) Interleukin-1 β and interleukins-6 increase levels of apolipoprotein B mRNA and decrease accumulation of its protein in culture medium of HepG2 cells. *J. Lipid Res.*, **39**:103-113.
137. Zhou, M., Wu, X., Huang, L.-S., and Ginsberg, H.N. (1995) Apoprotein B-100, an inefficiently translocated secretory protein, is bound to the cytosolic chaperone, heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.*, **270** (42) :25220-25224.
138. Zhou, M., Fisher, E.A., and Ginsberg, H.N. (1998) Regulated co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100. A new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *J. Biol. Chem.*, **273** (38) :24649-24653.

Remerciements

J'aimerais particulièrement remercier mon directeur de recherche, le Dr Emile Levy, pour m'avoir dirigée de façon exceptionnelle tout au long de ma maîtrise. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir fait confiance. J'ai acquis énormément de connaissances dans les domaines de la physiologie intestinale, de la biologie cellulaire et de la nutrition et je désire vous manifester mon appréciation. J'ai reçu, grâce à vous, une formation remarquable qui de toute évidence contribuera au lancement de ma carrière professionnelle. Finalement, je vous remercie pour votre humanisme, votre sensibilité et pour m'avoir encouragée et transmis votre passion pour la recherche durant ces deux dernières années.

Bien sûr, j'aimerais également remercier tous les collaborateurs qui ont participé à mon projet de recherche. Le Dr Christiane Malo pour m'avoir si généreusement fourni la majorité des échantillons sur lesquels j'ai travaillé, le Dr Moise Bendayan pour ses excellents travaux en microscopie électronique et le Dr Edgard Delvin pour son esprit critique et ses judicieux conseils.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire du Dr Emile Levy pour m'avoir si bien accueillie parmi vous et pour m'avoir supportée techniquement et moralement. Ces deux dernières années passées en votre compagnie ont été des plus agréables : Louise, Elena, Ioan, Simona, Sandra, Monika, Stéphanie, Carole et Valérie, merci pour tout. Je voudrais spécialement remercier Nadia Dubé qui m'a si patiemment guidée dans mes débuts en recherche. De toi Nadia j'ai tant appris : la persévérance, la détermination, l'esprit critique, le soucis du travail bien fait, l'organisation et j'en passe. Ce dont je dois surtout te remercier c'est pour ton amitié inconditionnelle. Merci d'avoir toujours été disponible pour me conseiller, m'aider et m'encourager; tout simplement, merci d'être présente dans ma vie.

Finalement, je voudrais remercier ma famille, Louise, Eddy et Martine, pour leurs encouragements et spécialement mon âme sœur, Patrick, sans qui l'accomplissement de ce projet de maîtrise n'aurait pas été possible.