

Université de Montréal

2M11-2662.4

**Modulation de l'expression génique et de la synthèse protéique de  
l'apolipoprotéine A-IV par les acides gras.**

par

Simona STAN

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.)  
en Nutrition

août 1998

© Simona STAN, 1998



2011, 2002, 2004

Université de Montréal

QU  
145  
U58  
1999  
V.001

Modulation de l'expression génique et de la réponse protéique de l'apoptose A-V par les acides gras

par

Simone St-Amand

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en sciences de la nutrition

2011

Université de Montréal



**Page d'identification du jury**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Modulation de l'expression génique et de la synthèse protéique de l'apolipoprotéine A-IV par les acides gras.**

Présenté par:

Simona STAN

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

|                     |                          |
|---------------------|--------------------------|
| Dr. Marielle Ledoux | Présidente du jury       |
| Dr. Emile Levy      | Directeur de recherche   |
| Dr. Edgard Delvin   | Codirecteur de recherche |
| Dr. Jane Montgomery | Membre du jury           |

Mémoire accepté le 26 octobre 1998

## Sommaire

Au niveau plasmatique, les différentes classes de lipides sont transportées par des complexes macromoléculaires communément appelés lipoprotéines. Ces dernières sont caractérisées par la présence d'une ou plusieurs protéines (ou apolipoprotéines) qui leur confèrent des propriétés déterminant leur structure, ainsi que leur métabolisme intravasculaire. Parmi ces apolipoprotéines, l'apo A-IV se distingue par son rôle et ses multiples fonctions.

L'apo A-IV humaine est une glycoprotéine de 46-kd synthétisée exclusivement par l'intestin. Dans le plasma, cette apolipoprotéine est retrouvée sous forme libre ou associée aux lipoprotéines riches en triglycérides (les chylomicrons et les VLDL) et aux lipoprotéines de haute densité (HDL). Elle est étroitement impliquée dans le métabolisme des lipoprotéines en modulant les activités de la lipoprotéine lipase (LPL) et de la lécithine :cholestérol acyltransférase (LCAT), le flux du cholestérol périphérique, le transport inverse du cholestérol et le métabolisme intravasculaire des HDL. Grâce à ces mécanismes, l'apo A-IV réduit considérablement le risque de développer l'athérosclérose. Au niveau du système nerveux central, l'apo A-IV agirait en tant que signal de satiété et serait donc en mesure de réduire l'apport alimentaire. Par ailleurs, l'augmentation des taux de synthèse et de sécrétion de l'apo A-IV suit étroitement un repas riche en matières grasses, ce qui établit, de manière évidente, une relation entre le métabolisme lipidique et l'appétit. Dans le même ordre d'idées, de très récentes découvertes confèrent à l'apo A-IV un rôle de neurotransmetteur et de neuromodulateur capable d'inhiber la sécrétion de l'acide et de la vidange gastriques. En outre, l'apo A-IV peut être régulée par de nombreux facteurs tels que: diverses hormones (hormones thyroïdiennes, insuline, glucocorticoïdes, oestrogènes) stade du développement, plusieurs nutriments (matières grasses, protéines, glucides et nucléotides), ainsi que les fibrates. Le dernier type d'influence est de nature biliaire. Cependant, les composantes biliaires responsables n'ont pas encore été identifiées. Étant donné les nombreuses fonctions importantes de l'apo A-IV, on doit accorder une attention particulière à l'élucidation des mécanismes contrôlant la synthèse et la sécrétion de cette apolipoprotéine. Même si le processus d'absorption des matières grasses module

l'apo A-IV intestinale, l'influence des différentes classes d'acides gras sur l'expression génique et la synthèse protéique demeure jusqu'à ce jour inconnue. Par conséquent, l'objectif de ce projet est d'évaluer les effets modulateurs des acides gras oléique (n-9), linoléique (n-6), linoléique (n-3) et docosahénoïque (n-3) sur l'expression génique, la synthèse protéique et la concentration de l'apo A-IV, et ce, lors de deux périodes d'incubation, l'une de courte durée (30 minutes) et la deuxième, de longue durée (20 heures). Le modèle intestinal utilisé est représenté par les cellules Caco-2, puisque cette lignée cellulaire détient un nombre considérable de caractéristiques morphologiques et biochimiques des entérocytes et récapitule même une partie de leurs fonctions telles que l'absorption et le transport. De plus, dans notre laboratoire ce type de cellules s'est avéré à plusieurs reprises, un modèle approprié lorsqu'on a procédé à l'investigation de la sécrétion des apolipoprotéines. La détermination des niveaux d'ARNm est effectuée par « RT-PCR », combinée à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (5%) et à la quantification par PhosphorImager. La synthèse de l'apo A-IV est mesurée par l'incorporation d'un précurseur radioactif ( $^{35}\text{S}$ -méthionine) et sa concentration par chimiluminescence. Nos résultats révèlent qu'à 30 minutes, la synthèse *de novo* est abaissée, ce qui se traduit par une diminution des niveaux d'apo A-IV. Par contre, à plus long terme (20 heures), ces deux paramètres sont augmentés en présence d'acides gras. En outre, nos observations mettent en évidence l'augmentation des niveaux d'ARNm d'apo A-IV qui sont certainement responsables de sa biogénèse. Nos données démontrent donc que les acides gras sont en mesure de moduler l'apo A-IV au niveau transcriptionnel. De plus, les acides oléique et docosahénoïque semblent avoir un effet plus prononcé que les deux autres acides gras. Cependant, le degré d'insaturation et la longueur de la chaîne carbonée ne semblent exercer aucune influence. En concluant, les présentes données apportent un éclairage nouveau sur le rôle des acides gras monoinsaturés et polyinsaturés. Ces derniers induisent la synthèse de l'apo A-IV, un facteur préventif de l'athérosclérose et limitant la prise excessive d'aliments.

**Mots clés:** Apo A-IV, acides gras, cellules Caco-2, régulation, expression génique, synthèse, concentration.

## Table des matières

|  |               |
|--|---------------|
| <b>Page de titre .....</b>   | <b>p.i</b>    |
| <b>Page d'identification du jury.....</b>  | <b>p.ii</b>   |
| <b>Sommaire .....</b>  | <b>p.iii</b>  |
| <b>Table des matières.....</b>   | <b>p.v</b>    |
| <b>Liste des figures .....</b>   | <b>p.vii</b>  |
| <b>Liste des abréviations .....</b>  | <b>p.viii</b> |
| <b>Dédicace .....</b>  | <b>p.ix</b>   |
| <br>   |               |
| <b>I. Introduction.....</b>  | <b>p. 1</b>   |
| <u>1. Apo A-IV.....</u>  | p. 1          |
| 1.1 Propriétés physico-chimiques .....   | p. 1          |
| 1.2 Structure du gène et polymorphismes .....  | p. 2          |
| 1.3 Effet des polymorphismes sur le profil lipidique .....   | p. 3          |
| 1.4 Transport de l'apo A-IV .....  | p. 5          |
| 1.5 Catabolisme .....  | p. 8          |
| <u>2. Fonctions exercées par l'apo A-IV .....</u>  | p. 8          |
| 2.1 Signal de satiété.....   | p. 8          |
| 2.2 Activation de certaines enzymes impliquées dans<br>le métabolisme lipidique .....                | p.11          |
| 2.2.1 Lipoprotéine lipase (LPL) .....  | p.11          |
| 2.2.2 Lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT) .....   | p.12          |
| 2.2.3 Protéine de transfert du cholestérol estérifié (CEP) .....                                     | p.12          |
| 2.3 Efflux du cholestérol.....   | p.13          |
| 2.4 Ulcère gastrique .....   | p.13          |
| 2.5 Athérosclérose .....   | p.14          |
| <u>3. Facteurs modulant l'expression génique et la synthèse protéique<br/>    de l'apo A-IV.....</u> | p.15          |
| 3.1 Les acides gras .....  | p.15          |
| 3.2 Le cholestérol.....  | p.17          |
| 3.3 Protéines, glucides et nucléotides.....  | p.18          |

|  |      |
|--|------|
| 3.4 Régulation au cours du développement.....  | p.19 |
| 3.5 Régulation hormonale .....   | p.20 |
| 3.6 Régulation biliaire.....   | p.21 |
| <br>   |      |
| <u>4. Régulation pré et posttranscriptionnelle de l'expression génique</u> .   | p.23 |
| <u>5. Apo A-IV et PPAR</u> .....   | p.25 |
| <u>6. Hypothèse et objectifs</u> .....   | p.26 |
| <br>   |      |
| <b>II. Article: Modulation of apo A-IV transcript levels and synthesis by<br/>n-3, n-6 and n-9 fatty acids in Caco-2 cells</b> |      |
| Abstract .....   | p.28 |
| Introduction.....  | p.29 |
| Materials and Methods .....  | p.31 |
| Results .....  | p.36 |
| Discussion .....   | p.39 |
| Acknowledgments .....  | p.42 |
| Legends to figures.....  | p.43 |
| References .....   | p.45 |
| Figures .....  | p.49 |
| <br>   |      |
| <b>III. Discussion et conclusions générales</b> .....  | p.55 |
| <br>   |      |
| <b>IV. Références</b> .....  | p.61 |
| <br>   |      |
| <b>V. Remerciements</b> .....  | p.x  |

## Liste des figures

**Figure 1**: Structure du chylomicron ..... p. 7

**Figure 2**: Régulation transcriptionnelle du gène de l'apo A-IV ..... p. 25

## Liste des abréviations

|          |   |
|----------|---|
| ACAT:    | Acyl-CoA:cholestérol- acyltransférase (2.3.1.26)*                                   |
| ADN:     | Acide désoxyribonucléique   |
| apo:     | Apolipoprotéine   |
| ARNm:    | Acide ribonucléique messenger   |
| ARP-1:   | Protéine régulatrice de l'apo A-I   |
| CETP:    | Protéine de transfert du cholestérol estérifié (cholesterol ester transfer protein) |
| COUP-TF: | Facteur de transcription activant le promoteur du gène de l'ovalbumine de poulet    |
| EGF:     | Facteur de croissance épidermique   |
| HDL:     | Lipoprotéine de haute densité (high-density lipoprotein)                            |
| HNF:     | Facteur nucléaire hépatique   |
| kDa:     | Kilodaltons   |
| LCAT:    | Lécithine-cholestérol-acyltransférase (2.3.1.43)*                                   |
| LDL:     | Lipoprotéine de faible densité (low-density lipoprotein)                            |
| LPL:     | Lipoprotéine lipase (3.1.1.34)*   |
| mg:      | Milligramme   |
| MJ:      | Mégajoules  |
| PPAR:    | Récepteurs activés par des agents induisant la prolifération des péroxysomes.       |
| PTU:     | Propylthiouracyl  |
| PYY:     | Peptide tyrosine- tyrosine  |
| TCL:     | Triglycérides à chaînes longues   |
| TCM:     | Triglycérides à chaînes moyennes  |
| VLDL:    | Lipoprotéine de très faible densité (very low density lipoprotein)                  |

\* : nomenclature officielle (9)

À Assad, pour son anniversaire...

Cu drag, parintilor mei, lui Simi si lui Mamaia pentru dragostea si ajutorul lor...

## Introduction

### 1. Apo A-IV

#### 1.1) *Propriétés physico-chimiques*

Le caractère hydrophobe des lipides et la nécessité de transporter plusieurs d'entre eux dans le milieu sanguin, un milieu aqueux, font appel à la formation des lipoprotéines, des particules miscibles à l'eau. Ces dernières sont composées de lipides non polaires (triacylglycérols et esters de cholestérol) enveloppés par des lipides polaires (phospholipides et cholestérol). Cependant, la présence d'une fraction protéique à la surface de la lipoprotéine n'est pas à ignorer. Ces apolipoprotéines exercent de nombreuses fonctions liées au transport des lipoprotéines. De plus, elles sont en mesure de participer activement au métabolisme de ces dernières en servant comme cofacteurs de certaines enzymes, en modulant les protéines de transfert de lipides et en se présentant comme ligands des récepteurs lipoprotéiques au niveau des tissus (59).

L'apo A-IV se retrouve parmi ces apolipoprotéines, et s'en distingue par ses multiples fonctions. L'apo A-IV humaine est une glycoprotéine de 46 kDa, d'origine exclusivement entérocytaire, contrairement à ce qu'on retrouve chez le rat et la souris, espèces produisant l'apo A-IV d'origine autant intestinale qu'hépatique. Elle est initialement synthétisée en tant que préapolipoprotéine, dont la masse est de 49 kDa et qui, suite à une maturation par un processus protéolytique co-translationnel, adopte sa forme finale, celle d'apo A-IV. Ainsi, le produit primaire de traduction se distingue de la forme finale par la présence d'un peptide "signal" d'une longueur de 20 acides aminés, retrouvé à l'extrémité NH<sub>3</sub> (37). L'analyse de la structure de l'apo A-IV humaine révèle de nombreuses propriétés qui lui confèrent un caractère distinct. En effet, elle possède une structure secondaire particulière dont près de 54% des résidus forment des hélices  $\alpha$ . Le maintien des hélices  $\alpha$  est d'une importance capitale en ce qui concerne l'association avec les surfaces lipidiques des lipoprotéines. Cependant, l'apo A-IV contient aussi un domaine hydrophobe, solidement maintenu par les

structures tertiaires et quaternaires de la protéine. C'est de ce caractère hydrophobe que découle la capacité de l'apo A-IV de former des dimères, selon un processus nécessitant une faible énergie, ce qui défavorise l'interaction avec les substrats lipidiques. Conséquemment, la liaison de l'apo A-IV aux surfaces lipidiques est extrêmement faible et se trouve facilement influencée par l'environnement, ce qui la distingue des autres apolipoprotéines (20). Dans ce contexte, Weinberg et ses collaborateurs ont démontré que la capacité de l'apo A-IV d'interagir avec les particules d'HDL était fortement modulée par la pression retrouvée à la surface de la particule, et lors d'une saturation, l'apo A-IV est éjectée de la particule d'HDL. Ceci suggère que le caractère labile de son attachement aux particules lipidiques est à la base du rôle de l'apo A-IV dans leur métabolisme (109).

### *1.2) Structure du gène et polymorphismes*

Le gène codant pour l'apo A-IV provenant de l'humain et du rat a été cloné et séquencé (107). Chez l'humain, il est situé sur le bras long du chromosome 11 et fait partie d'un groupement de gènes contenant aussi ceux codant pour les apolipoprotéines A-I et C-III. D'ailleurs, les gènes des apolipoprotéines A-IV, A-I et E émergent d'une même séquence ancestrale, ce qui établit un rapprochement étroit entre elles (24). Quant aux autres apolipoprotéines, exception faite des apos D et B, leurs gènes contiennent quatre exons et trois introns, dont le premier intron interrompt la région 5' non traduite du message. Par contre, le gène de l'apo A-IV ne contient que trois exons et deux introns et se distingue par l'absence du premier intron, destiné à interrompre la région 5' non traduite du message (15).

L'apo A-IV manifeste des polymorphismes génétiques, détectés par électrophorèse en deux dimensions ou par détermination du point isoélectrique (114), qui donnent naissance, dans la population caucasienne, à huit allèles différentes: apo A-IV-0 - apo A-IV-7 (46). Les fréquences des deux isoformes les plus communes varient entre 0.85 et 0.97 pour l'apo A-IV-1, l'allèle "normale" et entre 0.01 et 0.11 en ce qui concerne l'apo A-IV-2, l'allèle "mutée"(115). Les

autres isoformes sont d'une extrême rareté (6). Ce n'est que très récemment que l'on a identifié la mutation à l'origine de ce polymorphisme. Il s'agit de la substitution, au niveau du codon 360, de la guanine par une thymine, ce qui se traduit par le remplacement des acides aminés (glutamine → histidine) (114). Un autre site polymorphique a été identifié au niveau du codon 347 (substitution de la thréonine par la sérine). Par contre, c'est uniquement la mutation retrouvée sur le codon 360 qui est traduite par un polymorphisme au niveau protéique (6,114). Ainsi, on crée deux phénotypes homozygotes: apo A-IV 1/1 et apo A-IV 2/2, et un phénotype hétérozygote, apo A-IV1/2 (107). Un dernier site polymorphique a été localisé dans le deuxième intron du gène de l'apo A-IV, et ce, à l'aide de l'enzyme de restriction XbaI (115). Les répercussions de ces polymorphismes sur le profil lipidique et le métabolisme lipoprotéique sont détaillées plus loin.

### *1.3) Effet des polymorphismes sur le profil lipidique*

Le rôle des niveaux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides dans le développement des maladies cardio-vasculaires n'est plus à démontrer. Par ailleurs, étant donné la nature multifactorielle de ces pathologies, la contribution de la composante génétique reste à explorer. En effet, les variations génétiques pouvant affecter la composition et le métabolisme des lipoprotéines permettent de mieux estimer la susceptibilité vis-à-vis ce type de maladies. Tout en tenant compte de l'implication de l'apo A-IV dans le métabolisme des lipoprotéines, il est primordial d'évaluer l'influence des polymorphismes de cette apolipoprotéine sur le profil lipidique, ainsi que sur les changements survenant suite à l'ingestion de diètes variant dans leur composition lipidique. Tel que mentionné auparavant, trois types de polymorphismes de l'apo A-IV ont été identifiés et étudiés au niveau des codons 360 et 347, ainsi que du deuxième intron du gène. La première mutation donne naissance à deux isoformes, l'une plus répandue, l'apo A-IV-1 et l'allèle mutée, l'apo A-IV-2 (114). Jusqu'à présent, l'association entre ces polymorphismes et le métabolisme des lipoprotéines présente encore un certain degré d'ambiguïté. Dans certaines populations présumées saines, il semble y avoir une certaine influence, ce qui n'est pas le cas dans d'autres. Ainsi, au sein

de la population française, aucun des trois polymorphismes mentionnés ne se traduit par des changements dans le profil lipidique (115). Par contre, les niveaux de glucose étaient plus élevés en présence du phénotype apo A-IV 1/2, ce qui suggère l'existence d'un lien entre les niveaux plasmatiques de glucose et le métabolisme des lipoprotéines (107). Cette association a été explorée dans les cas de diabète où on connaît la forte incidence de maladies cardio-vasculaires et de dyslipidémies. De même, lors d'une étude effectuée au sein d'un groupe de patients atteints de diabète de type II, le phénotype apo A-IV 1/2 se manifeste chez des cas témoins par une augmentation des niveaux d'HDL et d'HDL<sub>2</sub>, et ce, en comparaison avec le phénotype apo A-IV 1/1. Par contre, cet effet est absent chez les patients diabétiques. En conséquence, il est suggéré que le phénotype apo A-IV 1/2 détient une fonction de protection contre l'athérosclérose, mais cet effet est perdu en présence de diabète (105). De façon similaire, une absence totale d'association entre les polymorphismes d'apo A-IV au niveau des codons 360 et 347 et le transport des lipides a été documentée, et ce, au sein d'une population hyperlipidémique (17).

L'effet de la variabilité polymorphique de l'apo A-IV sur le métabolisme des lipoprotéines n'est apparent que dans certains pays. Des données provenant d'Islande et du Tyrol révèlent que le phénotype apo A-IV 1/2 est caractérisé par une augmentation des niveaux d'HDL et une diminution des triglycérides, tandis qu'en Allemagne, le même phénotype est responsable d'une hausse de 10% des niveaux de LDL (6). Aucun effet n'a été enregistré aux Pays Bas et au sein d'une population constituée de Mexicains-Américains du sud du Texas (42).

D'autre part, la présence de l'allèle apo A-IV-2 atténue la réponse hypercholestérolémique survenue suite à l'ingestion de courte durée d'une diète enrichie en cholestérol. Cependant, la quantité de cholestérol ingérée (1100 mg) dépasse considérablement celle consommée par la population en général. Il reste donc à déterminer si l'effet de l'allèle apo A-IV-2 est réservé aux fortes concentrations de cholestérol (62). Dans le même ordre d'idées, le passage d'une diète typique nord-américaine (35-41 % lipides dont 13-16% sont saturées et 31-45 mg de cholestérol/MJ) à celle recommandée par la phase II du Programme d'Éducation Nationale en matière de Cholestérol (18-29 % lipides dont 4-7% sont

saturées et 11-20 mg de cholestérol/MJ) s'est manifesté, dans le cas des hommes possédant le phénotype 1/2, par une légère diminution supplémentaire, et ce, en comparaison avec ceux portant le phénotype 1/1 (45). La mutation située au niveau du codon 347 s'exprime par des changements des niveaux de cholestérol total et de LDL (47) et la présence de sérine s'affirme par une diminution des niveaux de LDL et une augmentation des taux des HDL (6). Les mécanismes par lesquels cette mutation exerce un certain contrôle sur le métabolisme des lipoprotéines reste à élucider. Il est évident que des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les effets précis des polymorphismes de l'apo A-IV. Des mesures devraient être prises pour contrôler et expliquer la disparité des résultats.

#### *1.4) Transport de l'apo A-IV*

En premier lieu, l'apo A-IV synthétisée dans le réticulum endoplasmique se lie aux lipides dans l'appareil de Golgi et par la suite, elle est sécrétée à la surface des lipoprotéines riches en triglycérides d'origine intestinale: les chylomicrons (Fig.1) et les VLDL (15). Il a été bien établi que la synthèse d'apo A-IV augmente considérablement suite à un repas riche en lipides. Grâce à l'utilisation, chez le rat, d'un surfactant hydrophobe non-ionique (Pluronic L-81) capable d'inhiber la formation de chylomicrons sans affecter l'absorption de lipides et la formation de triglycérides, de nombreuses données ont été obtenues quant au lien existant entre les matières grasses diététiques et la production d'apo A-IV. Ces études suggèrent que, la présence des lipides à l'intérieur des entérocytes n'est pas suffisante pour induire une augmentation de l'apo A-IV. En effet, les événements impliqués dans le processus d'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines seraient à la base du stimulus (44).

La controverse persiste en ce qui a trait à la distribution plasmatique de l'apo A-IV dans les classes lipoprotéiniques. La variabilité provient de la diversité des méthodes employées. Les premières études documentaient qu'à l'état de jeun, 95% de l'apo A-IV circulante se trouve à l'état libre. La technique alors utilisée était l'ultracentrifugation. Cependant, ces études n'ont pas tenu compte de

la faible affinité de l'apo A-IV pour les surfaces lipidiques des lipoprotéines. L'incapacité de cette méthode à détecter l'apo A-IV liée à la fraction d'HDL provient des centrifugations répétitives capables de briser le lien fragile existant entre l'apolipoprotéine et son environnement lipidique (104). Cependant, lorsque des techniques basées sur la chromatographie ont été employées, la distribution de l'apo A-IV s'est révélée quelque peu différente: 24% de l'apo A-IV est associée aux HDL et 76% se trouve sous une forme libre. Dans les cas d'abêtalipoprotéïnémie, une condition caractérisée par la malabsorption intestinale et l'absence de chylomicrons et de VLDL, les niveaux d'apo A-IV sont considérablement abaissés. De plus, l'absence d'apo A-IV dans la majorité des sous-classes d'HDL suggère qu'une proportion de celle-ci est transférée par les lipoprotéines riches en triglycérides. Par ailleurs, lors d'un repas riche en lipides, l'apo A-IV se répartit comme suit: 3% associée aux lipoprotéines riches en triglycérides, 26% associée aux HDL et 71% dans la fraction libre. Certaines études rapportent la présence d'apo A-IV dans une petite particule lipoprotéinique d'origine intestinale, dont le diamètre est de 7.8-8 nm (10).

Les études portant sur la cinétique de l'apo A-IV suggèrent plusieurs échanges. L'apo A-IV serait mobilisée de la fraction riche en triglycérides vers les particules d'HDL la fraction libre, et à partir des HDL, vers les deux premiers compartiments. Cependant, il semblerait que l'apo A-IV présente dans la fraction libre n'est pas transférée aux deux autres classes (68).

En conclusion, l'apo A-IV serait sécrétée dans la lymphe à la surface des lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons et VLDL) synthétisées par l'intestin. Dès l'apparition de ces particules lipoprotéiniques dans le milieu sanguin, on assiste à un détachement de l'apo A-IV des lipoprotéines (constituant ainsi la fraction "libre") ou à un transfert rapide de l'apo A-IV vers les particules d'HDL.

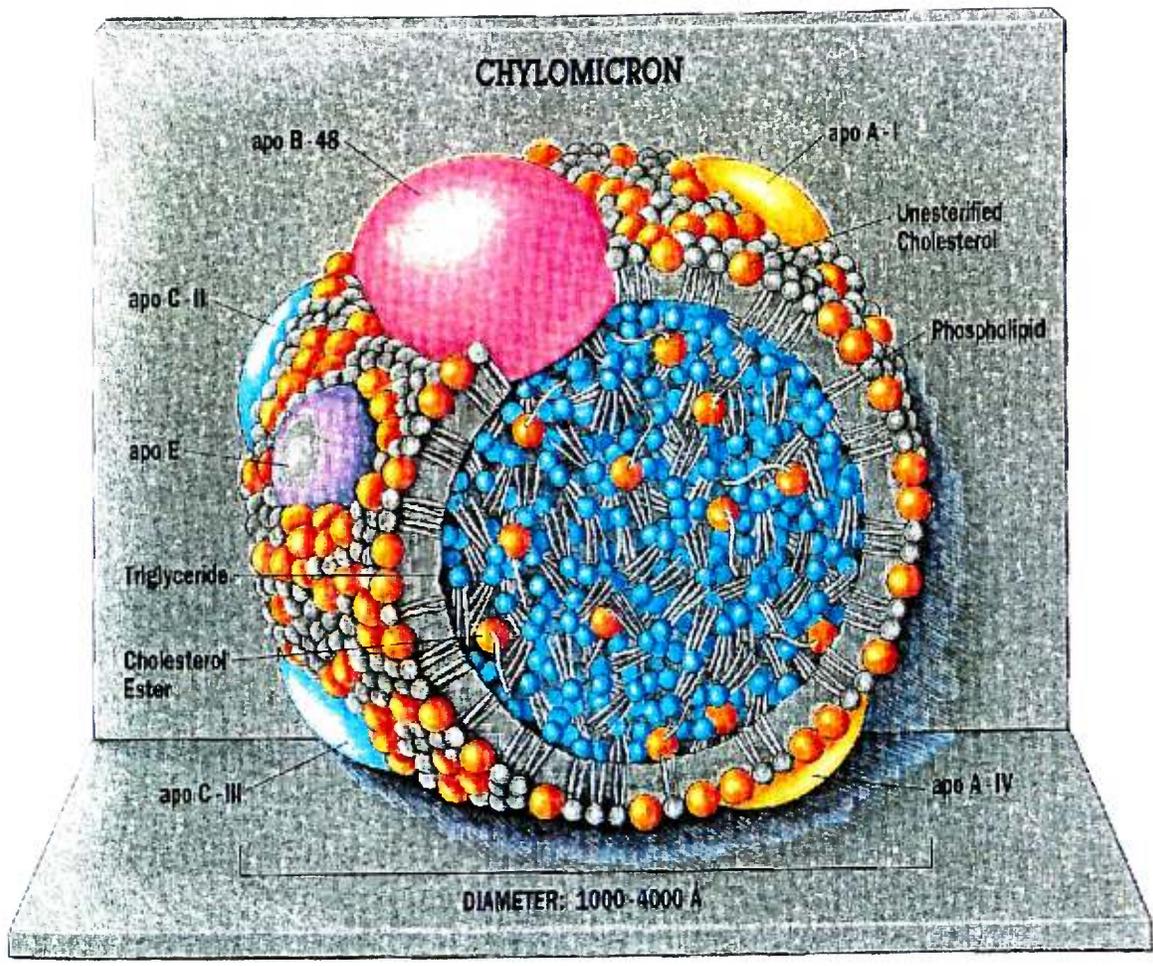


Fig: 1 Structure du chylomicron (Adaptée de Grundy, 1990)

### 1.5) *Catabolisme*

Malgré le fait que l'identité des organes et des événements impliqués dans le catabolisme de l'apo A-IV ne soient pas connus avec exactitude, le foie se présente comme un candidat potentiel. Chez le rat, le foie représente le site principal de dégradation de l'apo A-IV associée à la particule d'HDL (15). De plus, le rein y contribue de manière non négligeable, puisqu'on assiste à une élévation des niveaux d'apo A-IV dans les cas de syndrome néphrotique (84). D'autre part, il est à préciser que l'apo A-IV libre, dont le temps de séjour dans le plasma est de 0.55 jour, est plus rapidement dégradée que le complexe apo A-IV-HDL, résidant dans le plasma pendant 1.61 jours (15). Dans le même sens, l'apo A-IV-1 est plus rapidement catabolisée que l'apo A-IV-2 (74).

## 2. Fonctions exercées par l'apo A-IV

### 2.1) *Signal de satiété*

Le rôle de l'apo A-IV en tant que signal de satiété demeure jusqu'à ce jour controversé. Ainsi, l'administration de lymphé prélevée suite à une infusion intraduodénale de lipides provoque un effet anorectique, et ce, chez les rats préalablement exposés à un jeûne de 24 heures. De plus, la lymphé recueillie avant l'infusion ou suite à un mélange de lipides et de Pluronic L-81, perd sa capacité d'inhiber la prise alimentaire. Le même phénomène se produit lorsque l'apo A-IV a été éliminée de la lymphé par immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps monospécifique. Dans le même ordre d'idées, l'administration par voie intraveineuse d'apo A-IV extraite de la lymphé après un repas riche en graisses, inhibe la prise alimentaire et cette fonction est spécifique à l'apo A-IV, puisqu'elle n'est pas présente dans le cas de l'apo A-I. Ceci confère à l'apo A-IV le rôle de signal de satiété (31). Cet effet anorectique de l'apo A-IV est proportionnel à la dose administrée (99), ce qui se manifeste par une réduction de la quantité de nourriture ingérée chez les rats nourris *ad libitum* (29,99). Par contre, il n'y a

aucun changement relatif aux intervalles entre les repas, à la vitesse avec laquelle les animaux s'alimentent, au temps s'écoulant entre l'infusion d'apo A-IV et le premier repas, à l'activité ambulatoire ou à l'hydratation (29,31,99).

Il reste à élucider si l'apo A-IV agit au niveau du système nerveux central ou dans les organes périphériques, puisque des récepteurs cérébraux spécifiques à l'apo A-IV n'ont pas encore été identifiés, contrairement au foie (23) et au rein (35) qui possèdent des récepteurs de ce type. Fujimoto et ses collaborateurs ont tenté d'explorer l'action de l'apo A-IV sur le système nerveux central. Leurs résultats révèlent que l'infusion d'apo A-IV au niveau du troisième ventricule cérébral précède une réduction significative de la prise alimentaire. Cet effet disparaît lors du remplacement de l'apo A-IV par l'apo A-I. Une fois de plus, mise à part la prise alimentaire, d'autres effets, tels que la sédation, l'ataxie, l'hypothermie ou des changements au niveau de la consommation d'eau n'ont pas été notés. De plus, le traitement à l'aide de sérum destiné à capter l'apo A-IV et administré dans le troisième ventricule cause une augmentation de la prise alimentaire, ce qui suggère que l'apo A-IV agit centralement afin de moduler la consommation d'aliments. Par ailleurs, il est évident que l'apo A-IV est en mesure de traverser la barrière hémato-encéphalique, puisque ses niveaux augmentent dans le liquide céphalo-rachidien, et ce, suite à une infusion duodénale de lipides (30,63). Cependant, l'apo A-IV ne représente pas le seul facteur postabsorptif responsable de l'effet anorectique des lipides, étant donné que le blocage de la formation de chylomicrons par le Pluronic L-81 n'a fait qu'abaisser l'effet de satiété, sans pourtant l'éliminer (78).

Il est maintenant bien établi que l'effet de satiété produit par les matières grasses varie en fonction de la voie d'administration de ces dernières, ce qui donne naissance à la controverse entourant le rôle de satiété de l'apo A-IV. En effet, les lipides infusés directement dans le tractus gastro-intestinal inhibent considérablement la prise alimentaire, contrairement à l'ingestion normale dont l'effet est moindre ou parfois absent. Mise à part la voie d'administration des matières grasses, les différences au niveau des méthodes utilisées expliquent une partie des discordances existant entre les résultats obtenus. Ainsi, certains investigateurs soumettent les animaux à un jeûne total de 3.5 à 17 heures en

prévision de l'expérience, tandis que d'autres, employant une alimentation *ad libitum*, ne font pas appel à ce type de restriction. En ce qui concerne la prise alimentaire, la rapidité et l'efficacité des lipides infusés directement dans le tractus gastro-intestinal ont été bien documentées. Dans ce sens, les matières grasses ingérées n'inhibent l'appétit que légèrement et à court terme, et ce, dans le cas où une période postabsorptive est respectée. Par conséquent, il est convenu que les études utilisant l'administration directe de matières grasses au niveau intestinal ou gastrique tendent à surestimer le pouvoir anorectique de ces dernières (46).

Dans le même ordre d'idées, une étude effectuée sur deux lignées de souris transgéniques (HuAIVTg), l'une exprimant légèrement l'apo A-IV humaine et l'autre fortement, remet en question le rôle de signal de satiété de l'apo A-IV. En effet, lorsque les animaux sont soumis à une diète conventionnelle, les niveaux d'apo A-IV humaine sont de 6 et 25 fois supérieurs aux valeurs normales. En outre, lorsqu'une diète riche en matières grasses fut administrée, les valeurs d'apo A-IV humaine dépassent de 12 et 80 fois les niveaux normaux. Dans ce cas, on remarque que les concentrations d'apo A-IV murine triplent. Ce qui est intéressant à souligner, c'est l'absence de différences entre les groupes, par rapport au comportement alimentaire ou à l'augmentation du poids corporel (1). De même, l'étude de l'apo A-IV en tant que facteur anorectique nous porte aux mêmes conclusions lorsqu'on analyse les souris "knockout", des souris chez lesquelles le gène de l'apo A-IV a été inactivé. Étant donné le rôle de l'apo A-IV en tant que signal de satiété, une augmentation de la prise alimentaire est à prévoir. Cependant, le scénario est quelque peu différent des prévisions: les souris ont une croissance normale et un comportement alimentaire inchangé. Une exception est à mentionner: les souris mâles ont augmenté leur prise alimentaire pendant une période de 2 heures, ce qui était précédé par un jeûne de 18 heures (110).

En conclusion, d'autres études sont nécessaires pour investiguer le rôle central de l'apo A-IV dans la prise alimentaire. La confirmation de son action anorectique pourrait avoir un impact sur le traitement de l'obésité.

## 2.2) *Activation de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique: ( LPL, LCAT et CETP)*

### 2.2.1 Lipoprotéine lipase (LPL)

La fonction principale de la lipoprotéine lipase est d'hydrolyser les triacylglycérols provenant des chylomicrons et des VLDL afin de libérer les acides gras qui, par la suite, seront emmagasinés dans le tissu adipeux ou oxydés par le muscle. Elle est située dans la paroi des capillaires sanguins et pour maximiser son action, elle requiert son cofacteur, l'apo C-II. Cependant, les chylomicrons et les VLDL naissants ne contiennent pas d'apolipoprotéine C-II. Ces lipoprotéines vont l'acquérir à partir des HDL lors de leur passage dans la circulation. Donc, lors du métabolisme périphérique des lipoprotéines, ces dernières seront en mesure de fournir à l'enzyme à la fois le substrat et le cofacteur (59).

Plus précisément, les chylomicrons contiennent l'apo A-IV, mais pas l'apo C-II. Une proportion de cette apoprotéine est transférée durant le passage du chylomicron dans la lymphe, et une plus grande quantité, lorsqu'il traverse la barrière sanguine. Lorsque l'apo C-II est transférée aux chylomicrons, l'apo A-IV s'y détache pour se diriger vers les particules d'HDL (15). Par un processus de recyclage, lors de l'hydrolyse subséquente des chylomicrons, l'apo C-II retourne aux HDL (59). En résumé, le mécanisme initial consiste dans le déplacement de l'apo C-II vers les chylomicrons, suivi par l'acquisition de l'apo A-IV par les particules d'HDL (15). De plus, l'apo A-IV et l'apo C-II étant le foyer d'échanges dynamiques à la surface des lipoprotéines, il est suggéré que le processus par lequel l'apo A-IV module l'activité de la lipoprotéine lipase implique l'augmentation de la disponibilité de son cofacteur, l'apo C-II. L'apo A-IV semble donc indispensable au détachement efficace de l'apo C-II de la particule d'HDL. Par contre, l'apo A-IV n'exerce cet effet qu'en présence de lipoprotéines, puisqu'elle s'avère inefficace lors d'un contact avec l'apo C-II libre (36). En conclusion, l'apo A-IV augmente l'activité de la lipoprotéine lipase en facilitant le déplacement de l'apo C-II des HDL vers les chylomicrons, et ce, dans la lymphe et dans la circulation.

### 2.2.2 Lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT)

L'action de la LCAT consiste dans l'estérification du cholestérol, plus précisément dans la catalyse du transfert d'un résidu d'acide gras de la lécithine au cholestérol, pour la formation d'esters de cholestérol. Elle est synthétisée dans le foie, mais elle agit au niveau plasmatique. Chez l'humain, cette enzyme est responsable de l'estérification de la quasi-totalité du cholestérol plasmatique, ce qui n'est pas le cas chez le rat, où une autre enzyme hépatique, l'acyl-CoA:cholestérol-acyltransférase assure l'estérification du cholestérol et son exportation massive vers les VLDL naissantes (61). La LCAT est associée aux petites particules d'HDL: les particules discoïdales (15). Suivant le gradient de concentration, on assiste à une attraction du cholestérol des tissus et des autres lipoprotéines vers les HDL qui voient leur densité diminuer. L'enrichissement des HDL en cholestérol ester donne ainsi naissance à des particules d'HDL<sub>2</sub>. Cette réaction est requise pour le transport inverse du cholestérol (15,61).

Il a été démontré que la LCAT nécessite un activateur de nature protéique. Plusieurs protéines candidates ont été identifiées: l'apo A-I, l'apo C-I, ainsi qu'un peptide analogue à l'apo C-I. Dernièrement, l'apo A-IV s'est avéré un activateur important de la LCAT, dans les études *in vitro* (94) et *in vivo* (52).

### 2.2.3 Protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP)

Il s'agit d'une protéine présente dans le plasma humain, mais pas dans celui des rats. Située à la surface de la particule d'HDL, elle favorise le transfert du cholestérol estérifié présent au sein de cette dernière vers les VLDL, LDL et, les chylomicrons, et ce, tout en permettant le passage de triglycérides dans la direction opposée (61,72). De plus, il a été démontré que la protéine de transfert du cholestérol estérifié détient un rôle de facteur de conversion susceptible de promouvoir le transfert des lipides, non seulement entre les HDL et les autres types de lipoprotéines, mais également à l'intérieur des sous-classes d'HDL. Lorsque l'apo A-IV est mise en présence de l'enzyme, elle est en mesure de modifier l'activité de cette dernière et d'élargir le spectre des sous-classes d'HDL.

À ce niveau, on constate la création de très petites particules d'HDL, potentiellement susceptibles de migrer plus facilement dans l'espace interstitiel pour promouvoir davantage l'efflux de cholestérol cellulaire (55). L'effet modulateur de l'apo A-IV s'explique par un contact direct entre l'apoprotéine et l'enzyme. Par ailleurs, la capacité de l'apo A-IV d'influencer la protéine de transfert du cholestérol estérifié dépend du rapport apolipoprotéine/lipoprotéine, puisqu'un ratio bas favorise le taux de transfert du cholestérol estérifié des HDL<sub>3</sub> vers les LDL. Par contre, un rapport élevé abaisse considérablement cette propriété de l'apo A-IV (41).

### *2.3) Efflux du cholestérol*

En outre, un des rôles de l'apo A-IV est de promouvoir l'efflux de cholestérol d'adipocytes de souris préalablement surchargés de cholestérol. Des études ont suggéré que la présence de l'apo A-IV dans le liquide interstitiel entourant le tissu adipeux joue un rôle important en ce qui concerne l'élimination du cholestérol des cellules périphériques (96). De plus, l'apo A-IV manifeste cet effet dans plusieurs autres types cellulaires tels que les fibroblastes de la peau et les cellules endothéliales de l'aorte (15).

### *2.4) Ulcère gastrique*

L'apo A-IV semble jouer un rôle de neuromodulateur de la fonction gastrique. En effet, chez le rat, l'apo A-IV administrée au niveau du système nerveux central inhibe la sécrétion d'acide gastrique, et diminue ainsi la sévérité des lésions de la muqueuse gastrique (69). De plus, on suggère que le système adrénergique, à travers les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, est à la base de cette action centrale. D'autres éléments, tels que le nerf vague et les prostaglandines ont été explorés, cependant, il s'est avéré qu'ils n'y sont nullement impliqués (70).

## 2.5) Athérosclérose

Le rôle de l'apo A-IV en tant que facteur de protection vis-à-vis l'athérogenèse demeure jusqu'à ce jour controversé. En effet, l'expression hépatique de l'apo A-IV humaine produit, chez des souris transgéniques susceptibles à l'athérogenèse, une diminution considérable des lésions athéromateuses. Cet effet est indépendant d'une augmentation des niveaux d'HDL (22). Les données obtenues chez des souris transgéniques portant plusieurs copies du gène de l'apo A-IV murine confirment cet effet protecteur, et on assiste à la prévention de la formation de lésions aortiques induites par une diète athérogénique. On a pu aussi démontrer que les particules d'HDL provenant des animaux transgéniques soumis à ce type de diète se sont avérés plus efficaces, d'une part, dans la promotion de l'efflux de cholestérol à partir de monocytes humains préalablement surchargés en cholestérol, et d'autre part, dans l'inhibition de l'oxydation des particules de LDL. Les propriétés antioxydantes des particules d'HDL sont dues, en partie, à la paraoxonase, dont l'activité est augmentée chez ces souris transgéniques (19). Il s'agit d'une enzyme retrouvée dans le sérum, associée aux HDL, et dont le rôle est d'hydrolyser de nombreux substrats, notamment les phosphates organiques tels que le paraoxon, un produit métabolique d'un pesticide largement répandu, le parathion. L'enzyme peut également dégrader les molécules proinflammatoires impliquées dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose, du vieillissement et du cancer. Ainsi, de faibles niveaux de paraoxonase ont été détectés en présence d'athérosclérose, d'hyperlipidémie et de diabète de type II. Finalement, des polymorphismes au niveau du gène codant pour la paraoxonase ont été étroitement associés à des maladies coronariennes (45). À la lumière de l'ensemble de ces résultats, plusieurs chercheurs ont convenu des bénéfices accrus de l'apo A-IV dans la prévention des maladies cardio-vasculaires.

Dans d'autres situations, les niveaux d'apo A-IV ne se sont pas révélés inversement proportionnels au risque de maladies cardio-vasculaires. Par exemple, chez les patients atteints de diabète de type II et contrairement aux

prévisions, des niveaux élevés d'apo A-IV ont été associés à une augmentation de la prévalence des maladies cardio-vasculaires (106).

### **3. Facteurs modulant l'expression génique et la synthèse protéique de l'apo A-IV**

#### *3.1) Les acides gras*

Il est très bien établi qu'il existe un lien très étroit entre la synthèse intestinale d'apo A-IV et l'absorption de lipides. En effet, l'expression génique, la synthèse et la sécrétion d'apo A-IV sont stimulées par la consommation de matières grasses. Il est à préciser que l'apo A-IV est l'unique apolipoprotéine qu'on peut moduler de cette manière (52). Tel que mentionné auparavant, la présence seule de lipides à l'intérieur des entérocytes n'est pas responsable de cet effet, puisqu'on a constaté que les événements impliqués dans les processus d'assemblage et de sécrétion des chylomicrons sont indispensables. De plus, les lipides sont à la base d'une régulation posttranscriptionnelle. À ce niveau, il est suggéré que les matières grasses augmentent le taux de transcription du gène de l'apo A-IV et la stabilité de l'ARNm (80). D'autre part, l'augmentation graduelle de la dose de triglycérides infusés directement dans le duodénum suggère qu'un recrutement de segments intestinaux vers la partie distale serait responsable de l'élévation des niveaux lymphatiques d'apo A-IV (50). En comparant les effets d'une infusion de lipides au niveau du duodénum et de l'iléon sur la synthèse d'apo A-IV, on a démontré que l'infusion iléale produit une augmentation de la synthèse d'apo A-IV au niveau du jéjunum. Cette constatation implique la présence d'autres facteurs de régulation de nature neurale ou hormonale dont l'origine serait la partie distale de l'intestin (51). Une des hypothèses expliquant ce phénomène serait l'implication du "frein iléal" dans l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'apo A-IV (82). Ce ralentissement est caractérisé par une diminution de la motilité et de la sécrétion pancréatique par l'inhibition de la vidange gastrique en présence de nutriments, notamment de lipides. Les

éléments causant cet ensemble d'effets sont représentés par des peptides de nature hormonale relâchés par la partie distale de l'intestin. Jusqu'à présent, le candidat potentiel est le PYY (peptide tyrosine-tyrosine). Étant synthétisé par les cellules endocrines, il est libéré en présence de lipides (52).

Un autre mécanisme proposé implique les signaux afférents sensibles à la capsaïcine. La capsaïcine (trans-8-méthyl-N-vanillyl-6-nonenamide) est l'ingrédient qui confère aux piments verts et rouges leur saveur piquante. Étant donné sa capacité d'activer les neurones sensoriels suscitant une sensation de douleur (33), cette substance fut utilisée pendant des siècles en tant que traitement de l'arthrite rhumatoïde ou de la neuropathie diabétique (98). Cependant, il ne s'agit pas ici de l'unique rôle de la capsaïcine. Récemment, on a attribué aux signaux afférents sensibles à la capsaïcine l'effet de satiété causé par les lipides intestinaux. La possibilité de l'intervention de tels signaux dans la stimulation de la synthèse et de la sécrétion d'apo A-IV a été explorée. À ce niveau, il a été démontré que la modulation de l'apo A-IV par les lipides est indépendante de la voie de la capsaïcine (48).

Quelques études ont porté sur la capacité des acides gras à stimuler la synthèse de l'apo A-IV, et ce, en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée. Chez le rat, l'infusion duodénale de deux solutions lipidiques, l'une contenant des triglycérides à chaînes longues (TCL) et l'autre, à base de triglycérides à chaînes moyennes (TCM) indique que les niveaux d'ARNm et d'apo A-IV lymphatique étaient augmentés dans les deux cas. Ces observations sont surprenantes quand on sait que les TCM empruntent la voie de la veine porte et les acides gras à longue chaîne, le système lymphatique. On voit donc que la réestérification des acides gras à l'intérieur de l'entérocyte et la formation des chylomicrons ne constitue pas un prérequis à l'induction de l'apo A-IV (66), comme il a été suggéré auparavant. Dans le même sens, des données provenant d'études effectuées sur des porcelets révèlent que l'efficacité des TCM à induire l'apo A-IV est équivalente à celle des TCL (12).

Bien au contraire, d'autres travaux ont rapporté qu'une infusion d'acides gras à longue chaîne stimule significativement autant la synthèse d'apo A-IV que sa sécrétion lymphatique, tandis que les acides gras à chaîne courte ou moyenne

n'avaient que très peu d'effet (49), ce qui appuie davantage l'hypothèse selon laquelle les mécanismes impliqués au niveau de la formation de chylomicrons sont requis afin de stimuler l'apo A-IV (50, 80). À la lumière de ces données ambiguës, il est évident que les mécanismes à la base de la stimulation de l'apo A-IV par les lipides demeurent inconnus. À ce niveau, on suggère la possibilité que la modulation de l'apo A-IV par les acides gras s'effectue à un stade d'absorption précédant celui comprenant la réestérification (12).

### 3.2) *Le cholestérol*

La controverse ne s'applique pas uniquement à la longueur des chaînes d'acides gras, mais aussi au rôle du cholestérol. Les effets du cholestérol diffèrent d'une espèce à une autre et selon les méthodes employées. Dans certains cas, il est suggéré que le cholestérol exerce un effet, autant sur la synthèse d'apo A-IV que sur ses valeurs plasmatiques. Ainsi, les données provenant de l'ingestion, d'une diète enrichie en cholestérol et en matières grasses, par des rats, révèlent que la présence de cholestérol est suivie par une diminution d'apo A-IV liée à la particule d'HDL et une augmentation au niveau de la fraction libre. Cependant, les niveaux plasmatiques d'apo A-IV ne sont pas affectés par ce type de diète (21). Par ailleurs, suite à une administration de cholestérol (0.1% de la diète d'origine) au rat, les niveaux hépatiques d'ARNm d'apo A-IV augmentent (71). De même, l'hypercholestérolémie induite par la diète (1%) cause une augmentation de l'expression génique d'apo A-IV dans le foie, sans pourtant en modifier les niveaux plasmatiques (85). Bien que l'intestin constitue le site majeur de synthèse d'apo A-IV chez le rat, on s'attend à ce que des changements de l'expression génique au niveau du foie se traduisent par des modifications à l'échelle plasmatique. Par conséquent, l'absence de traduction de l'ARNm indique la présence d'une régulation posttranscriptionnelle exercée par le cholestérol (85). Chez le lapin normolipidémique, une diète riche en cholestérol (0.5%) n'a aucunement affecté les niveaux d'apo A-IV, et ce, malgré une augmentation significative (18 fois supérieure) de la cholestérolémie. Cependant, une

hypercholestérolémie induite génétiquement révèle une diminution (d'environ 30%) des valeurs plasmatiques d'apo A-IV (64).

Ces données ne sont donc pas homogènes. Elles démontrent une variabilité de l'expression de l'apo A-IV selon l'espèce étudiée et ne peuvent donc pas être extrapolées à l'humain.

### *3.3) Protéines, glucides et nucléotides*

D'autres facteurs nutritionnels peuvent moduler l'expression génique et la synthèse protéique de l'apo A-IV. Certaines composantes du lait, comme la caséine et le lactose sont en mesure d'augmenter les niveaux intestinaux d'ARNm, sans pourtant affecter les niveaux plasmatiques de la protéine (80). La consommation d'hydrates de carbone par le rat, sous forme de sucrose, entraîne une augmentation des niveaux hépatiques d'ARNm d'apo A-IV secondaire à une hausse du taux de transcription (75). La même manifestation a été observée chez le rat Zucker, génétiquement obèse et hyperlipoprotéïnémique (97). Chez le rat nouveau-né, le lactose, le fructose, le glucose et le sucrose produisent une élévation autant des niveaux intestinaux d'ARNm que des valeurs plasmatiques d'apo A-IV. Le mécanisme proposé implique l'inhibition de l'oxydation des acides gras, effet secondaire d'un rapport insuline/glucagon élevé. En ce qui concerne les protéines, la stimulation dépend du type ingéré (81). Même les nucléotides peuvent induire l'élévation des niveaux d'apo A-IV. Ils sont reconnus pour accélérer la croissance et la maturation intestinales, ce qui est d'une importance capitale chez les enfants prématurés, dont l'activité de la LCAT est faible. L'enrichissement des formules en nucléotides, destinées aux nouveau-nés (notamment aux prématurés) pourrait donc améliorer le métabolisme des lipoprotéines en augmentant l'activité de la LCAT, et ce, à travers une modulation des niveaux d'apo A-IV (79).

### 3.4) Régulation au cours du développement

La régulation de l'expression génique et de la synthèse protéique de l'apo A-IV au cours du développement démontre un haut degré de spécificité au sein des espèces étudiées. Chez la souris, les niveaux intestinaux d'ARNm atteignent un pic avant la naissance, suivi par une diminution graduelle et une légère diminution entre la 30ème et la 50ème journée, pour ainsi gagner les niveaux adultes. Chez le rat, le pic se situe entre la naissance et les 10 premiers jours, suivi par une diminution graduelle, pour atteindre les niveaux adultes autour du 20ème jour. Quant aux variations au niveau du foie, elles diffèrent quelque peu de celles intestinales. Chez la souris, l'ARNm est détecté très tôt (16ème jour post-coïtum), le pic est atteint à la naissance, pour diminuer et augmenter de nouveau. Chez le rat, il n'apparaît pas avant le sevrage, vers la 14ème journée, ce qui précède une hausse graduelle des niveaux (25,90,112). La présence de l'ARNm de l'apo A-IV est à signaler dans le sac vitellin également, ce qui suggère que ce tissu foetal joue un rôle important dans le métabolisme lipidique lors de la gestation. De plus, il est à mentionner que les variations développementales d'apo A-IV sont en étroite relation avec celles des lipoprotéines (25). Chez l'humain, les niveaux d'apo A-IV sont très bas dans le cordon ombilical, pour faire place à une hausse radicale lors de la première semaine de vie. Les polymorphismes de l'apo A-IV mentionnés précédemment y sont déjà présents et la distribution au sein des différentes fractions est similaire à celle des adultes. D'une part, la présence d'ARNm a été détectée au niveau de l'intestin foetal mais pas dans le foie, et d'autre part, l'augmentation d'apo A-IV suit de près celle des lipides plasmatiques. Ceci suggère que cette hausse survenue en post-partum est due à une production intestinale induite, probablement et en partie, par l'alimentation du nouveau-né (95). Les changements hormonaux qui caractérisent la période périnatale contribuent de manière importante à la modulation des niveaux d'apo A-IV. Les influences hormonales seront traitées en détails dans le cadre du prochain chapitre.

### 3.5) Régulation hormonale

Il est bien établi à présent que la biogénèse de l'apo A-IV est également sous un contrôle de type hormonal. Ainsi, chez le rat, l'action des hormones thyroïdiennes se manifeste par une augmentation des niveaux d'ARNm hépatique, secondaire à une hausse du taux de transcription et de la stabilité de l'ARN (5,57, 90), mais l'effet demeure négligeable au niveau de l'intestin (5,11,90). Cette régulation est particulièrement intéressante, si on tient compte du fait que le rat est une espèce manifestant une résistance aux diètes athérogéniques, et ce, contrairement à d'autres espèces. Dans ce cas, des taux élevés d'hormones thyroïdiennes en sont responsables, puisque un traitement au propylthiouracyl (PTU), un médicament antithyroïdien, cause l'élimination de cette résistance, mais aussi une diminution des niveaux hépatiques d'ARNm d'apo A-IV, ce qui renforce le lien entre cette apolipoprotéine et l'athérogénèse (57). D'autres hormones ont démontré une influence dans le contrôle de l'apo A-IV. Ainsi, l'insuline (25) et les glucocorticoïdes (25,90,102) stimulent l'expression génique dans le foie, tel que démontré dans les hépatocytes en culture. A de plus faibles concentrations, l'effet de l'insuline se manifeste par des valeurs constantes ou abaissées d'apo A-IV, effet similaire à celui du glucagon (102). Chez le porcelet, l'insuline stimule la synthèse intestinale d'apo A-IV et cet effet est amplifié par l'hydrocortisone. Une augmentation de la synthèse a été aussi notée en présence du facteur de croissance EGF (11). L'estradiol, n'exerce aucun effet sur les quantités intestinales d'ARNm, mais diminue celles du foie, et ce, de manière proportionnelle à la dose administrée (90). Même si, globalement, les glucocorticoïdes augmentent les niveaux hépatiques d'ARNm d'apo A-IV, leurs effets varient en fonction du type de glucocorticoïde: la triamcinolone et la dexaméthasone démontrent plus d'efficacité que l'hydrocortisone. Par contre, les valeurs plasmatiques d'apo A-IV ne reflètent pas ces différences (91). Certains travaux précisent que les hormones thyroïdiennes sont responsables de l'accélération des changements notés dans les taux d'ARNm du foie de rat, et ce, tout au cours du développement (90).

En conclusion, la régulation hormonale de l'expression génique et de la synthèse protéique de l'apo A-IV reflète l'implication de plusieurs hormones dans le métabolisme des lipoprotéines et des apolipoprotéines.

### 3.6) *Régulation biliaire*

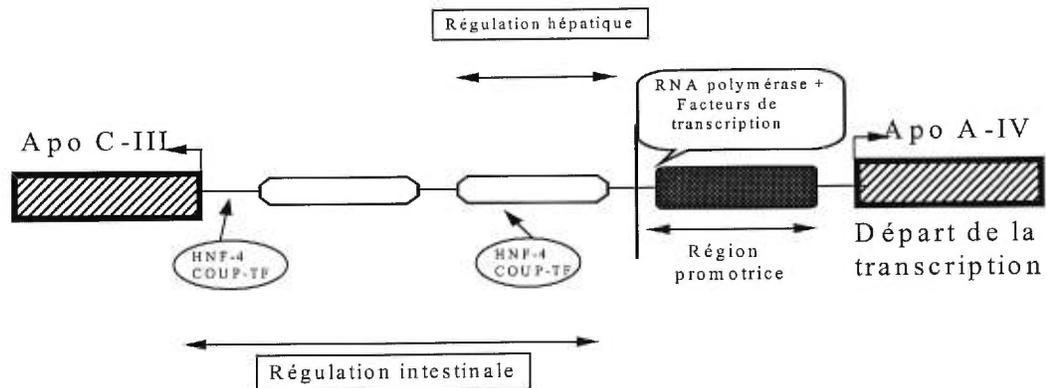
Étant donné le lien étroit existant entre l'absorption de lipides et la biogénèse de l'apo A-IV, il est essentiel d'évaluer le rôle de la bile. Cette sécrétion hépatique composée d'acides et de pigments biliaires, de cholestérol, d'acides gras estérifiés et non estérifiés, de phospholipides, ainsi que de sels minéraux possède de multiples fonctions: émulsification des lipides par les sels biliaires, étape indispensable à leur digestion et absorption, la neutralisation de l'acidité du chyme provenant de l'estomac et l'excrétion de cholestérol, d'acides biliaires, de toxines, de certains médicaments ainsi que de pigments biliaires. Par ces mécanismes, la bile participe activement à l'absorption de matières grasses au niveau de l'intestin (60). Lors de l'ingestion d'un repas lipidique, la majorité des acides biliaires sécrétés dans la bile sont réabsorbés au niveau de l'iléon. Ils sont ensuite acheminés vers le foie, via la veine porte, pour retourner de nouveau dans la bile. Cette voie "recyclante" porte le nom de cycle entérohépatique (103). Chez le rat, le traitement à la cholestyramine, un médicament qui entrave l'absorption intestinale des acides biliaires, abaisse considérablement les niveaux d'ARNm d'apo A-IV au niveau du jéjunum. En ce qui concerne l'iléon, on n'a remarqué qu'une légère tendance dans ce sens (88). De plus, on assiste à une diminution des valeurs plasmatiques d'apo A-IV en présence de cholestyramine (27). On propose donc que cette baisse est secondaire à une diminution de l'absorption de lipides due à une faible concentration d'acides biliaires. Il est à mentionner que la cholestyramine peut entraver l'absorption de matières grasses non seulement en diminuant la disponibilité des composés (les acides biliaires et les phospholipides) mais aussi en séquestrant d'autres éléments lipidiques, comme le cholestérol et les acides gras. Suite à cette constatation, des études plus approfondies ont été effectuées en utilisant la diversion biliaire. Ces expériences ont résulté en une baisse des niveaux d'ARNm dans l'iléon, mais aucun changement n'a été noté

dans le jéjunum. La supplémentation de la diète en sodium taurocholate (0.4%) n'a pas été en mesure de corriger cette diminution (87). Même en absence de lipides, la diversion biliaire produit des effets similaires, à savoir, une diminution de la synthèse et de la sécrétion d'apo A-IV. De plus, il est maintenant bien connu qu'à jeun, la sécrétion d'apo A-IV respecte un cycle circadien, et la diversion de la bile a comme effet une abolition de ce rythme (32). Si ces études apportent des preuves concrètes en faveur de l'importance de la bile dans la biogénèse de l'apo A-IV, les mécanismes restent à être élucidés. En effet, il reste à déterminer si la régulation s'effectue de manière directe ou simplement à travers la diminution de l'absorption des matières grasses. De plus, l'identité exacte des composantes biliaires responsables de cet effet n'a pas encore été définie. Des données récentes suggèrent que l'importance des sécrétions pancréatiques est comparable à celle de la bile. Elles parviennent dans l'intestin par une voie issue de l'union du canal de Wirsung et du cholédoque. Mise à part la présence d'eau, de minéraux et de protéines, le suc pancréatique contient de nombreuses enzymes: la lipase brisant les liaisons ester primaires des triacylglycérols et la phospholipase A<sub>2</sub> responsable de l'hydrolyse de la liaison ester en position 2 des glycérophospholipides pour ainsi créer des lysophospholipides qui contribuent à l'émulsification et à la digestion des matières grasses présentes dans l'intestin (60). Ainsi, toujours à jeun, et en présence d'une diversion biliaire ou pancréaticobiliaire dont les sécrétions sont acheminées vers l'iléon, les niveaux d'ARNm d'apo A-IV dans le jéjunum ont diminué de manière significative. En ce qui concerne l'iléon, une augmentation était à prévoir, et ce, dans les deux types de diversions. Tel ne fut pas le cas. En effet, lors de la diversion biliaire, les niveaux d'ARNm n'ont montré qu'une simple tendance vers l'augmentation et ce n'est qu'avec les sécrétions pancréatiques que ces niveaux se sont élevés significativement. Donc, les sécrétions pancréatiques jouent un rôle prépondérant dans la régulation de l'apo A-IV. Une explication possible fait intervenir la stimulation de la synthèse d'apo A-IV par les composantes biliaires (ex: Les phospholipides, dont 90% de la quantité quotidienne provient de la bile (52)), qui nécessitent l'action d'une hydrolase d'origine pancréatique (ex: la phospholipase A<sub>2</sub>) (89).

## 4. Régulation pré et posttranscriptionnelle de l'expression génique

L'intérêt porté à l'étude de la régulation de l'expression génique par les nutriments n'a fait qu'augmenter depuis quelques années. En effet, la mise au point des techniques de biologie moléculaire a permis de mieux évaluer les besoins nutritionnels, de caractériser davantage les effets nuisibles de la supplémentation et d'explorer les mécanismes par lesquels les nutriments modulent l'expression de certains gènes (18). Ainsi, la régulation des niveaux d'ARNm est régie par de multiples règles et principes, ce qui aura des répercussions sur la synthèse protéique et donc sur la totalité du métabolisme (39). La régulation transcriptionnelle implique le complexe d'initiation, constitué par le promoteur proximal, de nombreux facteurs transcriptionnels ainsi que de l'ARN polymérase. De plus, on y trouve des éléments *cis*- et *trans*-régulateurs. Les premiers représentent des séquences d'ADN dispersées sur la longueur de la région 5' du gène et pouvant se localiser en aval du site d'initiation également. Les autres types d'éléments régulateurs sont des protéines ou des substances d'autre nature qui, en créant un complexe avec les "*cis*", modifient le taux de transcription du gène visé. Cette régulation est le plus souvent positive, mais elle peut être négative dans certains cas. Un grand nombre d'hormones peuvent exercer la fonction d'élément régulateur: les stéroïdes (la progestérone et l'estradiol), les hormones thyroïdiennes, les rétinoïdes et la vitamine D (26,39). Elles agissent de manière directe, en formant un complexe hormone-récepteur qui, à son tour, se liera à l'ADN. Une activation de la transcription en suivra. Les récepteurs impliqués dans ce mécanisme portent le nom de "Superfamille des Récepteurs Nucléaires" (2,26). Il est important de remarquer que de nombreuses étapes limitantes, faisant partie de la régulation posttranscriptionnelle, peuvent exercer un contrôle étroit sur la quantité d'ARNm destinée à la synthèse protéique: un arrêt de la transcription, la production de séquences d'ARNm non fonctionnelles, la rétention des séquences matures dans le noyau, un arrêt de la traduction et, finalement, une dégradation cytoplasmique de l'ARNm (3). Donc, à l'état

d'équilibre, les niveaux d'ARN sont le résultat de la transcription, de la dégradation et du turnover. En ce qui concerne l'apo A-IV, il a été démontré qu'une régulation autant transcriptionnelle que posttranscriptionnelle détermine les niveaux d'ARNm. En effet, l'interaction des facteurs *cis*- présents sur le gène de l'apo A-IV et des facteurs de type *trans*- a été mise en évidence (47,76,77). Certains facteurs de transcription tels que l'HNF (facteur nucléaire hépatique), COUP-TF (facteur de transcription activant le promoteur du gène de l'ovalbumine de poulet), EAR-3 (récepteur relié au *v-erb*) et ARP-1 (protéine régulatrice de l'apo A-I), membres de la superfamille des récepteurs nucléaires orphelins de ligand sont connus pour leur implication dans le contrôle de l'expression génique de l'apo A-IV (Figure 2). L'étude de ces facteurs de type protéique est justifiée par leur liaison au niveau d'une séquence CP 3 située sur le promoteur du gène de l'apo CIII. La proximité des gènes de l'apo A-IV et de l'apo CIII donne naissance à l'hypothèse qu'ils sont impliqués dans la transcription du gène de l'apo A-IV également. HNF-4 possède le rôle d'activateur, tandis que EAR-1 et ARP-1 agissent en tant qu'inhibiteurs de la transcription. De plus, il a été démontré que la transcription des gènes d'apolipoprotéines dépend de la concentration et de l'affinité de ces protéines nucléaires pour les sites d'ADN. Ainsi, la présence d'autres éléments pourrait créer un déséquilibre à ce niveau et perturber le taux de transcription du gène de l'apo A-IV (52,67). En ce qui concerne la régulation posttranscriptionnelle, il est suggéré que les niveaux d'apo A-IV ne s'expliquent pas par les événements impliqués dans la transformation ou le transport de l'ARNm, mais surtout par le turnover (77). Malgré l'avancement des connaissances en matière de mécanismes impliqués dans la transcription du gène de l'apo A-IV, l'action exacte des hormones et des nutriments reste à explorer de manière plus détaillée.



**Fig: 2** Régulation transcriptionnelle du gène de l'apo A-IV  
(Adaptée de Bovard-Houppermans, 1994)

## 5. Apo A-IV et PPAR

Les peroxysomes représentent des organelles cellulaires, dont la principale fonction est la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Même si leur prolifération est connue depuis trente ans, ce n'est que très récemment que les mécanismes responsables ont été partiellement élucidés, et ce, par la découverte d'une nouvelle classe de récepteurs, membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens. Ils s'agit des PPAR ou plus précisément des récepteurs activés par des agents induisant la prolifération des péroxysomes (7,14,56,83,93,113). Jusqu'à présent, au moins quatre isoformes ont été découvertes, soit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et  $\delta$  (56). De nombreuses substances sont reconnues actuellement pour leur capacité d'induire la prolifération des peroxysomes: certaines classes de médicaments hypolipémiants tels que l'acide fibrique (90), des matières plastiques industrielles (14), les acides gras, spécialement ceux à très longue chaîne, comme les acides arachidonique et linoléique (14,56) et les pesticides (83). Chez le rat, la prolifération excessive des peroxysomes peut conduire à une

hépatocarcinogénèse (83). Malgré l'activation des PPAR par les substances citées ci-haut, seuls les dérivés des prostaglandines  $J_2$  constituent le ligand naturel des  $PPAR\gamma_2$  et les leukotriènes  $LTB_4$ , ceux des  $PPAR\alpha$ , respectivement (56,83). L'activation des PPAR donne naissance à un contrôle de l'expression génique d'une multitude d'éléments impliquées dans le métabolisme intra- et extracellulaire des lipides (83). Par conséquent, les PPAR sont des facteurs *trans-* agissant de manière indépendante ou en interagissant avec d'autres protéines nucléaires. Dans certains cas, ils forment des hétérodimères avec les RXR (récepteur aux rétinoïdes-X) (56).

Les fibrates sont utilisés en tant qu'hypolipémiants dans les cas d'hyperlipidémies réfractaires aux interventions diététiques. Leurs effets sont très diversifiés: diminution des niveaux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides, induction de l'expression génique de certains gènes codant pour des enzymes peroxysomiales, ce qui entraîne une prolifération des peroxysomes. Ainsi, un traitement de longue durée peut, dans certains cas, causer une hépatomégalie et, éventuellement, un hépatocarcinome. En ce qui a trait à l'apo A-IV, les fibrates (le fénofibrate, le clofibrate et le gemfibrozil) diminuent les taux d'ARNm hépatiques, tout en démontrant une constance soutenue dans l'intestin, reflétée également par une baisse des niveaux plasmatiques d'apo A-IV (90,92).

## 6. Hypothèse et objectifs

Tel que mentionné, les lipides représentent l'élément principal responsable de la stimulation de l'expression génique et la synthèse protéique de l'apo A-IV. Cependant, les mécanismes qui y sont impliqués demeurent jusqu'à ce jour obscurs. Pourtant, ces derniers sont extrêmement importants étant donné les multiples fonctions de l'apo A-IV. D'autre part, le rôle exact des acides gras ainsi que leur degré d'insaturation et la longueur de la chaîne carbonée restent à élucider. Dans ce sens, par ce projet, nous nous sommes appliqués à déterminer l'influence modulatrice de plusieurs classes d'acides gras: oléique (18:1 n-9), linoléique (18:2 n-6), linoléique (18:3 n-3) et docosahéxaénoïque (22:6 n-3). Le nombre de doubles liens est également exploré au regard des différents rôles des

acides gras, dépendants de leur degré d'insaturation. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons évalué la concentration, la synthèse *de novo* et l'expression génique, lors de deux périodes d'incubation, l'une de courte durée (30 minutes) et l'autre, plus prolongée (20 heures). Le modèle utilisé est représenté par les cellules Caco-2. Il s'agit d'une lignée cellulaire intestinale provenant d'un carcinome colorectal humain qui, lorsque mise en culture, a la capacité de se différencier. Ainsi, ces cellules deviennent un modèle approprié pour les études visant l'intestin, étant donné leur capacité d'accomplir les fonctions principales attribuées à cet organe, soient l'absorption, le transport et le métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Par ailleurs, elles ont l'aptitude de sécréter des apolipoprotéines, dont l'apo A-IV, offrant ainsi l'avantage d'explorer la modulation de cette apolipoprotéine par les acides gras en utilisant un modèle cellulaire humain, tout en contournant les variations dues à l'emploi d'un modèle animal (54).

## MODULATION OF APO A-IV TRANSCRIPT LEVELS AND SYNTHESIS BY n-3, n-6 AND n-9 FATTY ACIDS IN CACO-2 CELLS.

Simona Stan<sup>1</sup>, Edgard E. Delvin<sup>1</sup>, Thérèse Rouleau<sup>1</sup>,  
Armin Steinmetz<sup>2</sup>, and Emile Levy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Departments of Nutrition and Biochemistry, Centre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine, Université de Montréal, 3175 Ste-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada*

<sup>2</sup> *Klinikum Der Philipps-Universität Marburg, Baldinger Strasse D-35043 Marburg, Germany*

**Address correspondence to:** Dr. Emile Levy, Gastroenterology-Nutrition Unit, Ste-Justine Hospital, 3175 Ste-Catherine Road, Montreal (Quebec) H3T 1C5, Canada, Tel: (514) 345-4626, Fax: (514) 345-4999

**ABSTRACT:** It has been postulated that apolipoprotein (apo) A-IV plays various significant roles in lipid transport and lipoprotein metabolism. Although it is controlled by fat feeding, so far little else is known about its regulation by specific fatty acids. In this study, we focused on the modulation of apo A-IV mRNA levels, mass and biogenesis by mono- and polyunsaturated fatty acids (FA) in the human intestinal Caco-2 cell line. In confluent Caco-2 cells incubated with 1 mM oleic (n-9), linoleic (n-6), linolenic (n-3) or docosahexaenoic (n-3) acids for a long-term period, both apo A-IV protein levels and *de-novo* synthesis were increased. The induction resulted from the up-regulation of apo A-IV mRNA transcripts. In contrast, an inhibitory effect was evident with short-term incubation, suggesting the requirement of mRNA stability and/or chylomicron assembly. FA chain length and degree of unsaturation had little effect altering apo A-IV transcript and biogenesis. These data offer evidence that isolated fatty acids regulate gene expression and the production of apo A-IV in the enterocyte.

**Key words:** oleate; linoleate; linolenate; docosahexaenoate; intestine; apo A-IV mRNA; regulation

## INTRODUCTION

Apo A-IV is a 46-kD structural component of intestinal lipoproteins, such as chylomicrons and high-density lipoproteins [1-3]. Multiple functions have been postulated for apo A-IV. They include the stabilization of lipoprotein structure [4], the promotion of cellular cholesterol removal (a key component of reverse cholesterol transport) [5, 6], the activation of lipid-metabolizing enzymes [7, 8], and an antioxidant ability [9]. Recent work in transgenic mice has also provided evidence that overexpression of apo A-IV reduces susceptibility to aortic lesion formation and increases plasma HDL levels [10, 11]. Taken together, these observations suggest important anti-atherosclerotic characteristics for apo A-IV. In addition, the reported effects of apo A-IV on food intake and satiety as well as gastric emptying and gastric acid secretion [12-14] point to its physiological gastrointestinal relevance. If, as postulated by the aforementioned features, apo A-IV fulfills so many critical functions, knowledge of the regulation of its production is of major importance.

Apo A-IV seems to be particularly sensitive to dietary control. Fat ingestion results in pronounced apo A-IV output in mesenteric lymph of rats [15]. Its mRNA levels as well as its stability are also induced in the presence of triglycerides as shown in piglet intestinal explants [17]. Enhanced transcript levels were documented by many other studies [16,18], indicating that apo A-IV synthesis is modulated at the transcriptional level. Most of these data were generated from animal experiments. Very often, apo A-IV protein levels were determined in lymph or serum without reference of the tissue of origin. Furthermore, conflicting data have been reported, probably due to different methodologies, the source of dietary lipids

and the strains of animal models. For example, some investigators have concluded that the intestinal contribution of apo A-IV is unaltered by dietary lipids [19] and that apo A-IV regulation is more complex, beyond the transcription level and may reside anywhere between translation and clearance from plasma [20]. Extrapolation to the human species is complicated, since apo A-IV is largely restricted to the intestine [21], while in numerous animal species, it is produced by both the intestine and the liver [22]. Finally, in many studies on apo A-IV, animals were tested using mixtures of lipids, such as triglycerides and phospholipids without reference to fatty acid content. In the present investigation, we have addressed the modulation of apo A-IV gene expression, protein mass and *de novo* synthesis by specific fatty acids. Both n-3 and n-6 polyunsaturated as well as n-9 monounsaturated fatty acids were tested employing the Caco-2 cell line, a human enterocyte model that exhibits several morphological and biochemical characteristics of the small intestine.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

Caco-2 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in Minimum Essential Medium (MEM; GIBCO-BRL, Grand Island, NY), as previously described [23, 24]. The medium contained 1% penicillin/streptomycin and 1% MEM nonessential amino acids (GIBCO-BRL), and was supplemented with 10% decomplemented fetal bovine serum (FBS; Flow McLean, VA). Caco-2 cells (passages 30-40) were maintained in 175 cm<sup>2</sup> flasks (Corning, NY). Cultures were split (1:3 to 1:6) when they reached 70-90% confluence, using 0.05% trypsin-EDTA (0.5 mM; GIBCO-BRL).

For individual experiments, cells were plated at a density of 1X10<sup>6</sup> cells/well on 24.5-mm polycarbonate Transwell filter inserts with 0.4-µm pores (Costar, Cambridge, MA), in MEM (as above) supplemented with 5% FBS. Cells were cultured for 20 days, a period at which Caco-2 cells are highly differentiated and appropriate for lipid synthesis [23, 24], in a medium refreshed every second day. Experiments were carried out when monolayers were 5-7 days confluent. Transepithelial resistance was determined with an epithelial voltohmmeter using dual "chopstick" electrodes (World Precision Instruments, New Haven, CT).

### **Incubation of cells with lipids**

Cells were rinsed three times with serum-free MEM before adding 1 mM of one of the fatty acids complexed to bovine serum albumin on the apical side of the cells. The oleate/albumin complex was prepared as specified previously [25]. The

following fatty acids tested were oleic (18:1n-9), linoleic (18:2n-6), linolenic (18:3n-3) and docosahexaenoic (22:6n-3). Cells were incubated with these lipid effectors for 30 min or 20 h at 37°C unless stated otherwise. After incubation, apical and basolateral media were collected, pooled and centrifuged to remove cell debris. Apo A-IV was assessed as described below.

### **Apo A-IV measurement**

Caco-2 homogenates were prepared in phosphate-buffered saline, containing 1% (w/v) Triton X-100 1mM, phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM benzamidine, as described previously [26]. Aliquots of cell homogenates and media were centrifuged for 10 min at 18,000 g and 60 min at 105,000 g, respectively. Apo A-IV levels were determined on the resulting supernatants by SDS-polyacrylamide and transfer on a nitrocellulose membrane (Amersham), followed by the detection of an enhanced chemiluminescence system of antigen-antibody complexes. Preliminary experiments showed that within the conditions used, there was a direct relationship between the density of the apo A-IV band and the amount of either purified apo A-IV or pooled reference plasma. The apo A-IV amount was calculated using arbitrary units in comparison with the latter.

### ***De novo* apo A-IV synthesis**

Pulse labeling of Caco-2 cells and immunoprecipitation were carried out using standard methods [26]. Briefly, Caco-2 cells were incubated in a methionine-free medium, containing [<sup>35</sup>S]-methionine (300 µCi/ml, 50 Ci/mmol (Amersham) with or without specific unlabeled fatty acids. Then, the media from the apical and the basolateral sides were collected and pooled. Cells were scraped off the inserts in a

## MODULATION OF APO A-IV TRANSCRIPT LEVELS AND SYNTHESIS BY n-3, n-6 AND n-9 FATTY ACIDS IN CACO-2 CELLS.

Simona Stan<sup>1</sup>, Edgard E. Delvin<sup>1</sup>, Thérèse Rouleau<sup>1</sup>,  
Armin Steinmetz<sup>2</sup>, and Emile Levy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Departments of Nutrition and Biochemistry, Centre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine, Université de Montréal, 3175 Ste-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada*

<sup>2</sup> *Klinikum Der Philipps-Universität Marburg, Baldinger Strasse D-35043 Marburg, Germany*

**Address correspondence to:** Dr. Emile Levy, Gastroenterology-Nutrition Unit, Ste-Justine Hospital, 3175 Ste-Catherine Road, Montreal (Quebec) H3T 1C5, Canada, Tel: (514) 345-4626, Fax: (514) 345-4999

**ABSTRACT:** It has been postulated that apolipoprotein (apo) A-IV plays various significant roles in lipid transport and lipoprotein metabolism. Although it is controlled by fat feeding, so far little else is known about its regulation by specific fatty acids. In this study, we focused on the modulation of apo A-IV mRNA levels, mass and biogenesis by mono- and polyunsaturated fatty acids (FA) in the human intestinal Caco-2 cell line. In confluent Caco-2 cells incubated with 1 mM oleic (n-9), linoleic (n-6), linolenic (n-3) or docosahexaenoic (n-3) acids for a long-term period, both apo A-IV protein levels and *de-novo* synthesis were increased. The induction resulted from the up-regulation of apo A-IV mRNA transcripts. In contrast, an inhibitory effect was evident with short-term incubation, suggesting the requirement of mRNA stability and/or chylomicron assembly. FA chain length and degree of unsaturation had little effect altering apo A-IV transcript and biogenesis. These data offer evidence that isolated fatty acids regulate gene expression and the production of apo A-IV in the enterocyte.

**Key words:** oleate; linoleate; linolenate; docosahexaenoate; intestine; apo A-IV mRNA; regulation

## INTRODUCTION

Apo A-IV is a 46-kD structural component of intestinal lipoproteins, such as chylomicrons and high-density lipoproteins [1-3]. Multiple functions have been postulated for apo A-IV. They include the stabilization of lipoprotein structure [4], the promotion of cellular cholesterol removal (a key component of reverse cholesterol transport) [5, 6], the activation of lipid-metabolizing enzymes [7, 8], and an antioxidant ability [9]. Recent work in transgenic mice has also provided evidence that overexpression of apo A-IV reduces susceptibility to aortic lesion formation and increases plasma HDL levels [10, 11]. Taken together, these observations suggest important anti-atherosclerotic characteristics for apo A-IV. In addition, the reported effects of apo A-IV on food intake and satiety as well as gastric emptying and gastric acid secretion [12-14] point to its physiological gastrointestinal relevance. If, as postulated by the aforementioned features, apo A-IV fulfills so many critical functions, knowledge of the regulation of its production is of major importance.

Apo A-IV seems to be particularly sensitive to dietary control. Fat ingestion results in pronounced apo A-IV output in mesenteric lymph of rats [15]. Its mRNA levels as well as its stability are also induced in the presence of triglycerides as shown in piglet intestinal explants [17]. Enhanced transcript levels were documented by many other studies [16,18], indicating that apo A-IV synthesis is modulated at the transcriptional level. Most of these data were generated from animal experiments. Very often, apo A-IV protein levels were determined in lymph or serum without reference of the tissue of origin. Furthermore, conflicting data have been reported, probably due to different methodologies, the source of dietary lipids

and the strains of animal models. For example, some investigators have concluded that the intestinal contribution of apo A-IV is unaltered by dietary lipids [19] and that apo A-IV regulation is more complex, beyond the transcription level and may reside anywhere between translation and clearance from plasma [20]. Extrapolation to the human species is complicated, since apo A-IV is largely restricted to the intestine [21], while in numerous animal species, it is produced by both the intestine and the liver [22]. Finally, in many studies on apo A-IV, animals were tested using mixtures of lipids, such as triglycerides and phospholipids without reference to fatty acid content. In the present investigation, we have addressed the modulation of apo A-IV gene expression, protein mass and *de novo* synthesis by specific fatty acids. Both n-3 and n-6 polyunsaturated as well as n-9 monounsaturated fatty acids were tested employing the Caco-2 cell line, a human enterocyte model that exhibits several morphological and biochemical characteristics of the small intestine.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

Caco-2 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in Minimum Essential Medium (MEM; GIBCO-BRL, Grand Island, NY), as previously described [23, 24]. The medium contained 1% penicillin/streptomycin and 1% MEM nonessential amino acids (GIBCO-BRL), and was supplemented with 10% decomplemented fetal bovine serum (FBS; Flow McLean, VA). Caco-2 cells (passages 30-40) were maintained in 175 cm<sup>2</sup> flasks (Corning, NY). Cultures were split (1:3 to 1:6) when they reached 70-90% confluence, using 0.05% trypsin-EDTA (0.5 mM; GIBCO-BRL).

For individual experiments, cells were plated at a density of 1X10<sup>6</sup> cells/well on 24.5-mm polycarbonate Transwell filter inserts with 0.4-µm pores (Costar, Cambridge, MA), in MEM (as above) supplemented with 5% FBS. Cells were cultured for 20 days, a period at which Caco-2 cells are highly differentiated and appropriate for lipid synthesis [23, 24], in a medium refreshed every second day. Experiments were carried out when monolayers were 5-7 days confluent. Transepithelial resistance was determined with an epithelial voltohmmeter using dual "chopstick" electrodes (World Precision Instruments, New Haven, CT).

### **Incubation of cells with lipids**

Cells were rinsed three times with serum-free MEM before adding 1 mM of one of the fatty acids complexed to bovine serum albumin on the apical side of the cells. The oleate/albumin complex was prepared as specified previously [25]. The

following fatty acids tested were oleic (18:1n-9), linoleic (18:2n-6), linolenic (18:3n-3) and docosahexaenoic (22:6n-3). Cells were incubated with these lipid effectors for 30 min or 20 h at 37°C unless stated otherwise. After incubation, apical and basolateral media were collected, pooled and centrifuged to remove cell debris. Apo A-IV was assessed as described below.

### **Apo A-IV measurement**

Caco-2 homogenates were prepared in phosphate-buffered saline, containing 1% (w/v) Triton X-100 1mM, phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM benzamidine, as described previously [26]. Aliquots of cell homogenates and media were centrifuged for 10 min at 18,000 g and 60 min at 105,000 g, respectively. Apo A-IV levels were determined on the resulting supernatants by SDS-polyacrylamide and transfer on a nitrocellulose membrane (Amersham), followed by the detection of an enhanced chemiluminescence system of antigen-antibody complexes. Preliminary experiments showed that within the conditions used, there was a direct relationship between the density of the apo A-IV band and the amount of either purified apo A-IV or pooled reference plasma. The apo A-IV amount was calculated using arbitrary units in comparison with the latter.

### ***De novo* apo A-IV synthesis**

Pulse labeling of Caco-2 cells and immunoprecipitation were carried out using standard methods [26]. Briefly, Caco-2 cells were incubated in a methionine-free medium, containing [<sup>35</sup>S]-methionine (300 µCi/ml, 50 Ci/mmol (Amersham) with or without specific unlabeled fatty acids. Then, the media from the apical and the basolateral sides were collected and pooled. Cells were scraped off the inserts in a

cell lysis buffer (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, SDS 0.1%, Triton 1%, Na desoxycholate 0.5%). The medium and cell lysates were supplemented with the anti-protease mixture, as described above. Aliquots were precipitated with 20% trichloroacetic acid, and precipitates were washed three times with 5% trichloroacetic acid before the radioactivity was determined in a liquid scintillation spectrometer (Beckman Instruments, Fullerton, Ca). Media and homogenates were centrifuged as above and supernatants subsequently reacted with excess monoclonal antibodies for 18 h at 4°C. This antibody was purified as described previously [27]. Pansorbin (Calbiochem, CA) was then added, and the mixture was reincubated at 20°C for 60 min. The immunoprecipitates were washed extensively and analyzed by a linear 4-20% polyacrylamide gradient, preceded by a 3% stacking gel [26]. Gels were sectioned into 4-mm slices and counted after an overnight incubation at 20°C with 1 ml BTS-450 (Beckman Instruments) and 10 ml of liquid scintillation fluid (Ready Solv., Beckman Instruments). Homogenates were used for protein determinations according to Lowry *et al.* [29], using BSA (Bovine Serum Albumin) as a standard.

### **Sample extraction and RT-PCR analysis for gene expression assay**

After incubating Caco-2 cells in the presence or absence of the fatty acids studied, total RNA was isolated as described by Chomczynski and Sacchi [28] and treated with RQ1 Rnase-free Dnase (Promega). Single-strand cDNA was synthesized after denaturation of total RNA (10 µg, 15 min, 65°C) by a reverse transcription reaction, consisting of 0.5 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNATP, Pharmacia Biotech.), 10 mM DDT (Gibco BRL), 200 U SuperScript II

reverse RNase H transcriptase (Gibco), 30 U RNA guard (Pharmacia), RT buffer (50 mM Tris-HCl-pH 8.3, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl and 10 mM DTT) (GIBCO BRL). Reverse transcription was performed at 37°C for 2 h followed by inactivation (95°C for 5 min).

PCR amplification was performed with a Perkin-Elmer 9600 thermocycler (Perkin-Elmer, Norwalk) in a mixture containing 100 ng cDNA in a labeled amplification buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (Pharmacia), 2 μM up and down-stream primers (ACGT, Canada), 2.5 U Taq DNA polymerase (GIBCO BRL) and 2 μCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham). The amplification of apo A-IV and GAPDH was carried out with 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at the temperature specific to each primer for 1 min and, extension at 72°C for 2 min. The reaction ended with a 10-min incubation at 72°C. GAPDH was used as the housekeeping gene. For electrophoresis, samples (20 μl) were applied on 5% polyacrylamide gels. In order to determine A-IV mRNA, gels were exposed and scanned by PhosphorImager (Molecular Dynamics, CA).

The PCR primers used in this study were:

|           |                                    | <u>Annealing T° :</u> |
|-----------|------------------------------------|-----------------------|
| Apo A-IV: | 5':5'-CCCGATCTTCTGGCTCACCTCATT-3'  | 55 °C                 |
|           | 3':5'-AATGCCAAGGAGGCCGTTFFAACAT-3' |                       |
| GAPDH:    | 5':5'-CCCATCACCATCTTCCGA-3'        | 56.3 °C               |
|           | 3':5'-CATCACGCCACAGTTTCC-3'        |                       |

### **Statistical analysis**

Values are expressed as means  $\pm$  SEM. The raw data of treated cells were normalized to their corresponding controls. The statistical evaluation of the results was performed by one group Student *t*-test with control values equal to 100%.

## **RESULTS**

### **Cultured Caco-2 cells**

The experimental Caco-2 cell line used in the present study displayed functional and morphological similarities to mature enterocytes, as reported previously [23, 24]. Confluent cells developed a high degree of polarization, brush border microvilli, tight junctions and interdigitations. This was consistent with recovered high sucrase activity (15-20 IU/g cell protein) and transepithelial cell monolayer resistance (2000-3000 ohm x cm<sup>2</sup>). These observations indicate the adequacy of differentiated enterocyte-like intestinal Caco-2 for investigating the regulation of apo A-IV.

### **Effect of fatty acids on apo A-IV protein level**

Following the incubation of Caco-2 cells with 1 mM oleic, linoleic, linolenic or docosahexaenoic acid, the amount of apo A-IV was determined by the laser densitometric scanning of immunoblots prepared from native gels. As shown in Figure 1, there was a marked decrease of apo A-IV in Caco-2 monolayers exposed to fatty acids for 30 min. Cellular apo A-IV content was affected by all types of fatty acids during this short period, in contrast with the medium levels. As expected from these data, the total amount (equivalent to the apo A-IV accumulation in cell and medium) was substantially lowered by the presence of each n-3, n-6 and n-9 fatty acid tested.

On the other hand, a long-term incubation period (20 h) with the same fatty acids resulted in an increase of apo A-IV, recorded mainly in the cells. In sum,

maximal effect was generally noted on the total amount following supplementation with oleic and docosahexaenoic acids.

### **Effect of fatty acids on *de novo* synthesis and secretion**

The next series of experiments were conducted to assess the modulation of apo A-IV biogenesis and delivery by fatty acids. The estimation of these processes was evaluated by the incorporation of [<sup>35</sup>S]-methionine into apo A-IV, immunoprecipitation and electrophoresis. Figure 2 shows a representative gel scan, which reveals that apo A-IV *de novo* synthesis exceeded that of apo A-I in Caco-2 cells.

Caco-2 cells treated with free fatty acids attached to BSA demonstrated a propensity to synthesize and export more apo A-IV only when incubation was performed for 20 h (Figure 3). Docosahexaenoic acid tended to potentiate more induction of total apo A-IV production. The administration of fatty acids for 30 min strongly affected the accumulation of newly synthesized apo A-IV in cell and medium, corroborating our findings relative to apo A-IV protein levels.

### **Effect of fatty acids on apo A-IV mRNA levels**

Fatty acids were delivered to the apical surface of confluent monolayers in order to examine their effect on apo A-IV mRNA levels. Under our experimental conditions, PCR revealed abundant apo A-IV mRNA in Caco-2 cells. A preliminary experiment, consisting of the incubation of the cells with 1mM of oleic acid, for 30, 60, 120 minutes and 20 hours allowed us to observe that the apo A-IV transcript levels were decreased in short term experiments (30 and 60 minutes). However, at

20 h, this fatty acid provoked an increase in apo A-IV mRNA levels as documented by a representative experiment depicted in Figure 4. Due to these findings, all further experiments were conducted at 20 hours. Thus, when the apical culture medium was supplemented with the different fatty acids for 20 h, there was a significant increase in apo A-IV mRNA levels in the case of oleic, linoleic and docosahexaenoic acids (Figure 5), ranging from 125 to 160% when compared to controls. Although linolenic acid had some stimulatory effect, it did not reach statistical significance (Figure 6).

## **DISCUSSION**

Human colonic adenocarcinoma Caco-2 cells have largely been used as an intestinal model to determine the impact of different lipids on apolipoprotein synthesis and transport [38]. We took advantage of this convenient and accessible model for studying human apo A-IV regulation by isolated fatty acids. The data reported in this paper provide evidence that monounsaturated and polyunsaturated fatty acids of n-3, n-6 and n-9 families are able to promote protein accumulation and apo A-IV biogenesis. As shown by our findings, such effects evolved from the modulation of apo A-IV mRNA levels. Conditions for the stimulatory effects of fatty acids included a relatively long incubation time (20 h), in contrast to short periods (30 min) during which fatty acids exhibited inhibitory actions. Only a small influence on apo A-IV protein mass, *de novo* synthesis and gene expression was noticeable by the degree of unsaturation.

Many studies reported that the synthesis and secretion of apo A-IV are regulated by dietary triglycerides [15-18]. The output of apo A-IV into rat intestinal lymph as well as in human and animal blood circulation was stimulated by the ingestion of a fatty meal or alimentary triglycerides. Furthermore, in a variety of human pathologies involving impaired fat absorption, such as abetalipoproteinemia [30], chronic pancreatitis and malabsorptive syndromes [31], and in subjects receiving total parenteral nutrition [32], plasma apo A-IV levels were shown to be substantially decreased. Thus, Hayashi et al. [33] proposed that the intestinal absorption and transport of lipids were stimuli for intestinal apo A-IV synthesis. Our findings in Caco-2 cells, in response to the administration of fatty acids that differed

in chain length and double bonds, are consistent with the general observations documenting the control of apo A-IV synthesis by lipid nutrients. As the amounts of specific mRNA in Caco-2 increase in the presence of individual fatty acids, one may suggest that apo A-IV synthesis is regulated at the transcriptional level. However, it appears from our experiments that the threshold time required to induce apo A-IV is above 30-60 min, whereas periods equivalent to or shorter than 30 min favor the inhibition of apo A-IV synthesis by fatty acids. These data suggest that a minimal period is necessary for the assembly and secretion of chylomicrons, supposedly responsible for stimulating the production of apo A-IV by the small intestine [33]. Alternative mechanisms may include mRNA instability, insufficient intracellular fatty acid pool or decreased availability of fatty acids. The 5' nontranscribed region of the apo A-IV gene, as proposed by Gordon *et al.*, contains a short nucleotide sequence that may constitute a promoter region sensitive to increased intracellular fatty acid concentration [18]. A minimal period may be required to replete the critical cellular pool of fatty acids/triglycerides resulting in apo A-IV stimulation.

It is generally accepted that the lowering of TG levels by fish oil occurs via the impairment of the assembly of hepatic VLDL, and/or by inhibiting the secretion of newly synthesized apo B. The intestine would also contribute to the reduced plasma concentration of triacylglycerol after the ingestion of long-chain n-3 fatty acids. Recently, many studies have reported a decrease in the secretion of both triglyceride and apo B mass in cultured cells incubated with n-3 fatty acids [34]. In our experiments, docosahexaenoic and oleic acids were more potent than linoleic and linolenic acids in increasing the gene expression and synthesis/secretion of apo A-IV. This indicates that the assembly of chylomicrons rather than the secretion

process is actually responsible for the efficient stimulation of apo A-IV. Field, Albright and Mathur explored the regulatory effect of saturated and unsaturated fatty acids on the synthesis and secretion of triglyceride-rich lipoproteins by Caco-2 cells[35]. They reported that oleic acid potently stimulated triglyceride production by Caco-2 cells, followed in descending order by linoleic, linolenic, palmitic and myristic acids. However, eicosahexaenoic acid has been described as stimulating TG production in the way oleic acid does [36]. With respect to apo A-IV, a similar pattern was seen in our studies with unsaturated fatty acids, pointing out the importance of triglyceride synthesis. However, additional efforts are required for the elucidation of the mechanisms involved in lipid-regulated intestinal apo A-IV expression, in view of the unexpected, but controversial, observations related to medium-chain triglyceride effects. These lipids, which are secreted directly into the portal circulation rather than being re-esterified and incorporated into chylomicrons in the enterocyte, are as effective as long-chain triglycerides in up-regulating apo A-IV expression [37].

In conclusion, the data reported here demonstrate the ability of Caco-2 cells to produce substantial amounts of apo A-IV that can respond to monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. The regulation of apo A-IV synthesis by most of these fatty acids involves switching on its gene. Predominant effects are triggered by oleic and docosahexaenoic acids. Since a short-term incubation period with fatty acids leads to the inhibition of apo A-IV gene expression and biogenesis, one can suggest that a minimal period required for mRNA stability and/or chylomicron assembly is necessary to enhance apo A-IV production.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Carole Garofalo for technical assistance and Danielle St-Cyr for typing the manuscript. This work was supported by the Dairy Farmers of Canada and Medical Research Council of Canada, and constitutes a part of Simona Stan's M.Sc. thesis.

**Legends to figures.**

**Figure 1:** Effect of fatty acids on apo A-IV levels. Differentiated Caco-2 cells were incubated with 1 mM oleic, linoleic, linolenic or docosahexaenoic acid for 30 min or 20 h. The medium was then collected from the apical and basolateral chambers and pooled. Apo A-IV from cell homogenates (A) and media (B) was determined as described in Methods. Panel C depicts cell + medium values. Results are expressed as percentage relative to control values for n=3-5.

\*p<0.05, \*\*p<0.005.

**Figure 2:** Profile of <sup>35</sup>S-labeled apo A-IV versus other apolipoproteins synthesized by Caco-2 cells. Following 20 h incubation with unlabeled oleic acid and [<sup>35</sup>S]-methionine, apolipoproteins were immunoprecipitated and analyzed by SDS-PAGE. Data from a representative experiment are illustrated for cell homogenate.

**Figure 3:** Effect of individual fatty acids on *de novo* apo A-IV synthesis. Caco-2 cells were incubated with [<sup>35</sup>S]-methionine in the presence or absence of different fatty acids. Apo A-IV was immunoprecipitated and analyzed by SDS-PAGE. Data represent a percentage relative to control values.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005.

**Figure 4:** Representative effect of oleic acid on apo A-IV mRNA levels. Caco-2 cells were incubated with oleic acid during different periods of time and apo A-IV mRNA levels were determined by RT-PCR as described in Methods.

**Figure 5:** Representative effect of fatty acids on apo A-IV transcript levels. Caco-2 cells were incubated with 1 mM oleic, linoleic, linolenic or docosahexaenoic acid. Apo A-IV mRNA levels were assessed by RT-PCR as described in Methods.

**Figure 6:** Effect of fatty acids on apo A-IV mRNA levels. Following incubation of Caco-2 cells with the different fatty acids, the abundance of apo A-IV transcripts was assessed as described in Methods. Data are expressed as a % of control apo A-IV mRNA/control GAPDH mRNA ratio.

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.005$ .

**REFERENCES**

- [1] Beisiegel, U. and Utermann, G. (1979) *Eur. J. Biochem.* 93, 601-608.
- [2] Green, P.H.R., Glickman, R.M., Saudek, C.D., Blum, C.B. and Tall, A.R. (1979) *J. Clin. Invest.* 74, 233-242.
- [3] Green, P.H.R., Glickman, R.M., Riley, J.W. and Quinet, E. (1980) *J. Clin. Invest.* 65, 911-919.
- [4] Weinberg, R.B. and Spector, M.S. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 4914-4921.
- [5] Stein, O., Stein, Y., Lefevre, M. and Roheim, P.S. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* 878, 7-14.
- [6] Steinmetz, A., Barbaras, R., Ghalim, N., Clavey, V., Fruchart, J.C., Aihaud, G. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 7859-7863..
- [7] Goldberg, I.J., Scheraldi, C.A., Yacoub, L.K., Saxena, U. and Bisgaier, C.L. (1990) *J. Biol. Chem* 265, 4266-4272.
- [8] Steinmetz, A. and Utermann, G. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2258-2264.
- [9] Qin, X., Swertfeger, D.K., Zheng, S., Hui, D.Y. and Tso, P. (1998) *Am. J. Physiol.* 274 (Heart Circ. Physiol. 43), H1836-H1840.
- [10] Duverger, N., Tresp, G., Caillaud, J.M., Emmanuel, F., Castro, G., Fruchart, J.C., Steinmetz, A. and Denèfle, P. (1996) *Science* 273, 966-968.

- [11] Cohen, R.D., Castellani, L.W., Qiao, J.H., Van Lenten, B.J., Lusis, A.J. and Reue, K. (1997) *J. Clin. Invest.* 99, 1906-1916.
- [12] Fujimoto, K., Cardelli, J.A. and Tso, P. (1992) *Am. J. Physiol.* 262 (Gastrointest. Liver Physiol. 25), G1002-G1006.
- [13] Fujimoto, K., Fukagawa, K. Sakata, T. and Tso, P. (1993) *J. Clin. Invest.* 91, 1830-1833.
- [14] Okumura, T., Fukagawa, K., Tso, P., Taylor, I.L. and Pappas, T.N. (1995) *Gastroenterology* 109, 1583-1588.
- [15] Kalogeris, T.J., Fukagawa, K. and Tso, P. (1994) *J. Lipid Res.* 35, 1141-1151.
- [16] Apfelbaum, T.F., Davidson, N.O. and Glickman, R.M. (1987) *Am. J. Physiol.* 252, G662-G666.
- [17] Black, D.D., Rohwer-Nutter, P.L. and Davidson, N.O. (1990) *J. Lipid Res.* 30, 497-505.
- [18] Gordon, J.I., Smith, D.P., Alpers, D.H. and Strauss, A.W. (1982) *Biochemistry* 21, 5424-5431.
- [19] Windmueller, H.G. and Wu, A.-L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 3012-3016.
- [20] Srivastava, R.A.K., Kitchens, R.T. and Schonfeld, G. (1994) *Eur. J. Biochem.* 222, 507-514.

- [21] Elshourbagy, N.A., Walker, D.W., Bogusky, M.S., Gordon, J.I. and Taylor, J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 7973-7981.
- [22] Go, M.F., Schonfeld, G., Pflieger, B., Cole, T.G., Sussman, N.L. and Alpers, D.H. (1988) *J. Clin. Invest.* 81, 1615-1620.
- [23] Levy, E., Sinnott, D., Thibault, L., Nguyen, T.D., Delvin, E. and Ménard, D. (1996) *FEBS Letter* 393, 253-258.
- [24] Mehran, M., Seidman, E., Marchand, R., Gurbindo, C. and Levy, E. (1995) *Am. J. Physiol.* 269, G953-G960.
- [25] Levy, E., Thibault, L. and Ménard, D. (1992) *J. Lipid Res.* 33, 1607-1617.
- [26] Mehran, M., Levy, E., Bendayan, M. and Seidman, E. (1997) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 33, 118-128.
- [27] Steinmetz, A., Czekelius, P., Thiemann, E., Motzny, S. and Kaffarnik, H. (1988) *Atherosclerosis* 69, 21-27.
- [28] Messer, M. and Dahlqvist, A. (1966) *Anal. Biochem.* 14, 376-392.
- [29] Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D., et al. (1983) *Biol. Cell.* 47, 323-330.
- [30] Bisgaier, C.L., Sachdev, P.O., Megna, L. and Glickman, R.M. (1985) *J. Lipid Res.* 26, 11-25.
- [31] Koga, S., Miyata, Y., Funakoshi, A. and Ibayashi, H. (1985) *Digestion* 32, 19-24.

- [32] Sherman, J.R. and Weinger, R.B. (1988) *Gastroenterology* 95, 394-401.
- [33] Hayashi, H., Nutting, D.F., Fujimoto, K., Cardelli, J.A., Black, D. and Tso, P. (1990) *J. Lipid Res.* 31, 1613-1625.
- [34] Murthy, S., Albright, E., Mathur, S.N., Davidson, N.O. and Field, F.J. (1992) *Arteriosclerosis and Thrombosis* 12, 691-700.
- [35] Field, F.J., Albright, E. and Mathur, S.N. (1988) *J. Lipid Res.* 29, 1427-1437.
- [36] Ranheim, T., Gedde-Dahl, A., Rustan, A.C. and Drevon, C.A. (1992) *J. Lipid Res.* 33, 1281-1293.
- [37] Black, D.D., Wang, H., Hunter, F. and Zhan, R. (1996) *BBRC* 221, 619-624.
- [38] Levy, E., Mehran, M. and Seidman, E. (1995) *FASEB J.* 9, 626-635.

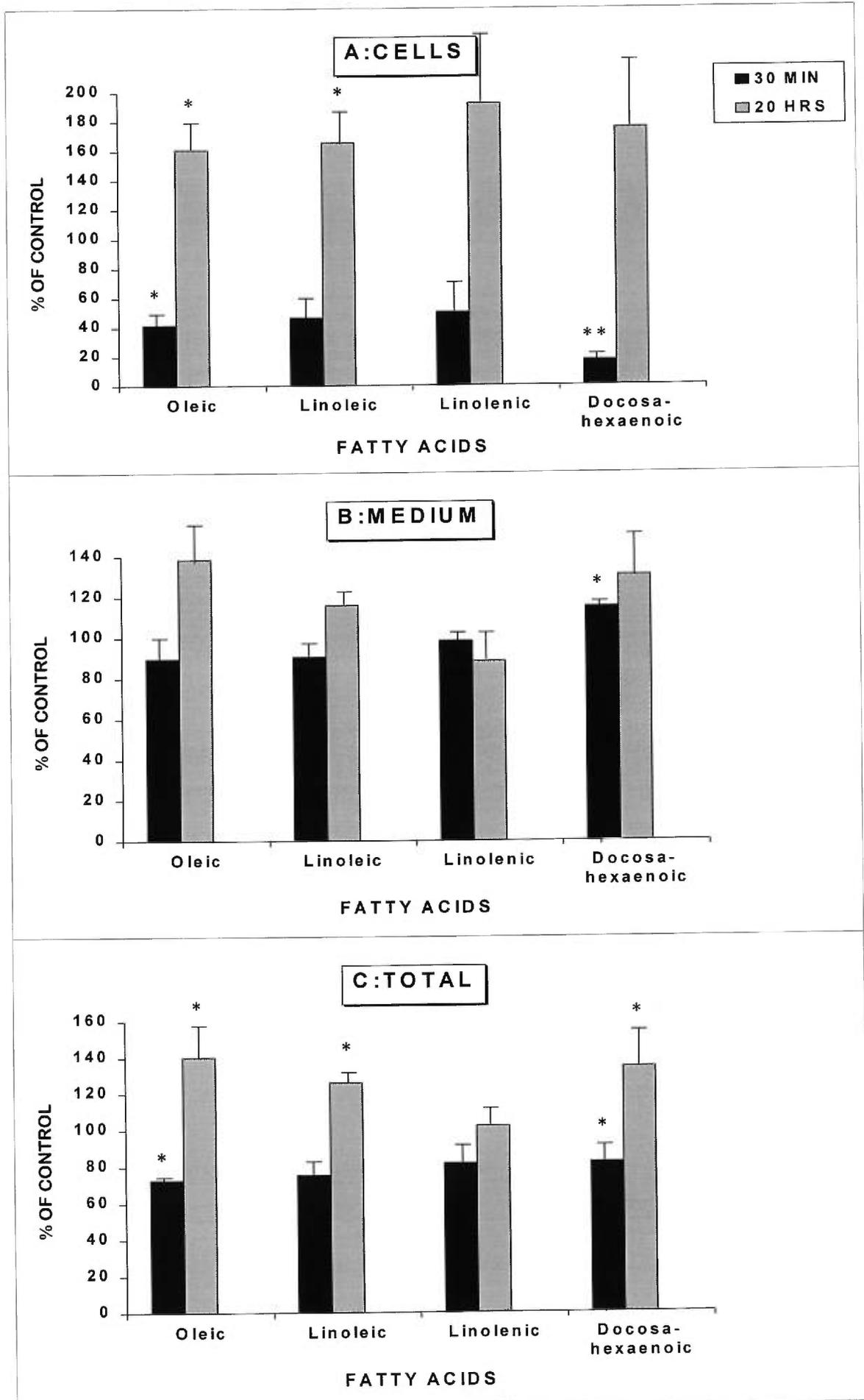


Figure 1

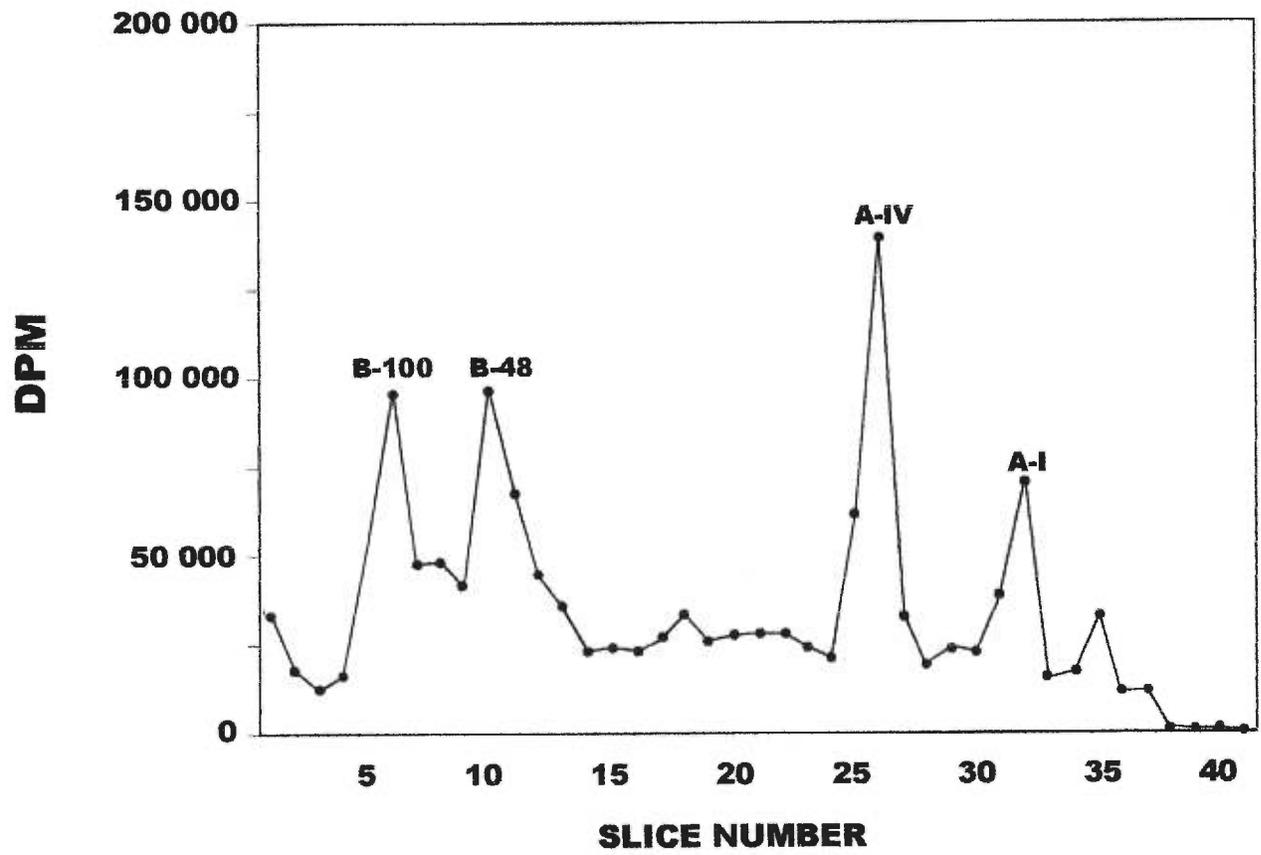


Figure 2

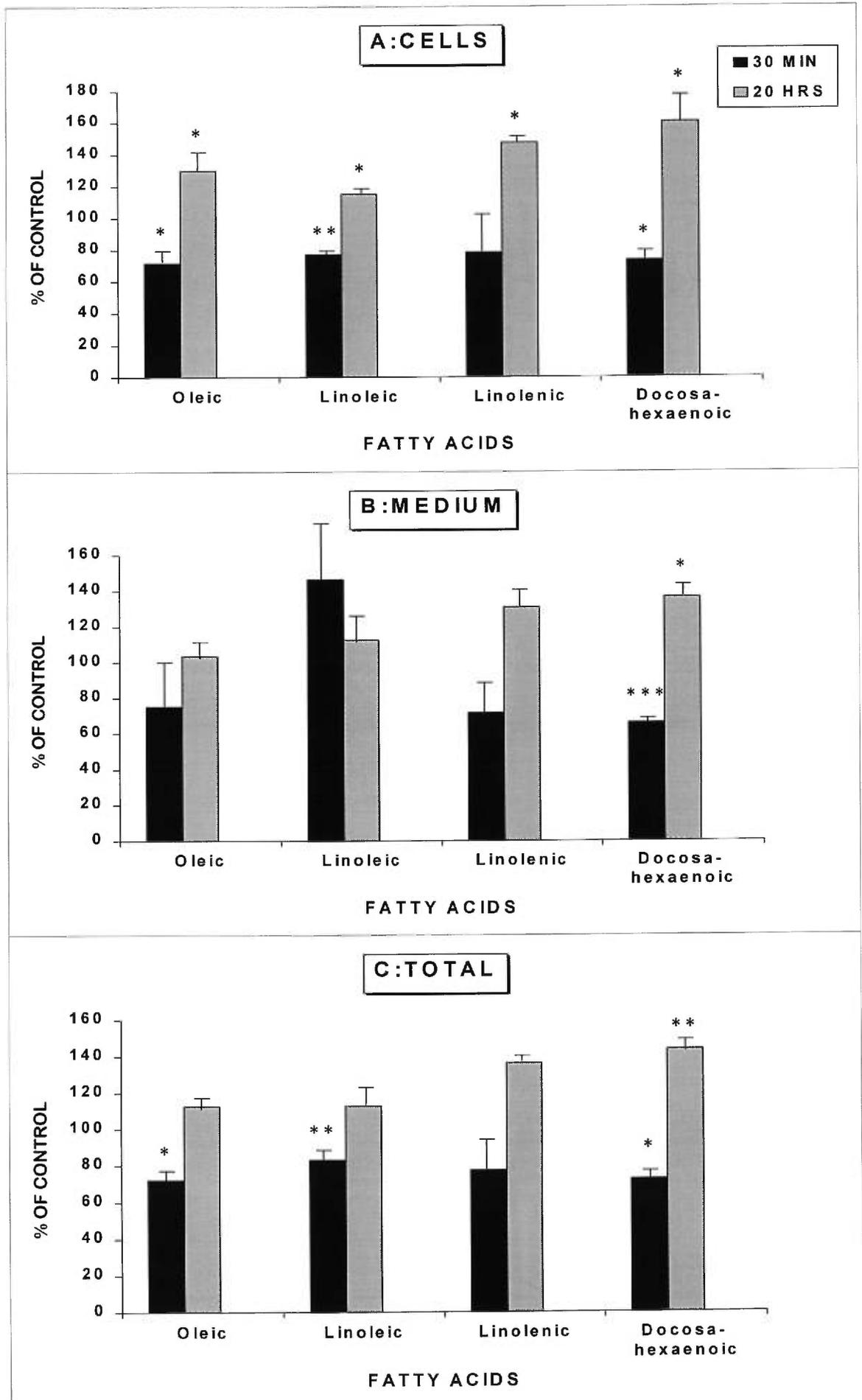


Figure 3

Figure 4.

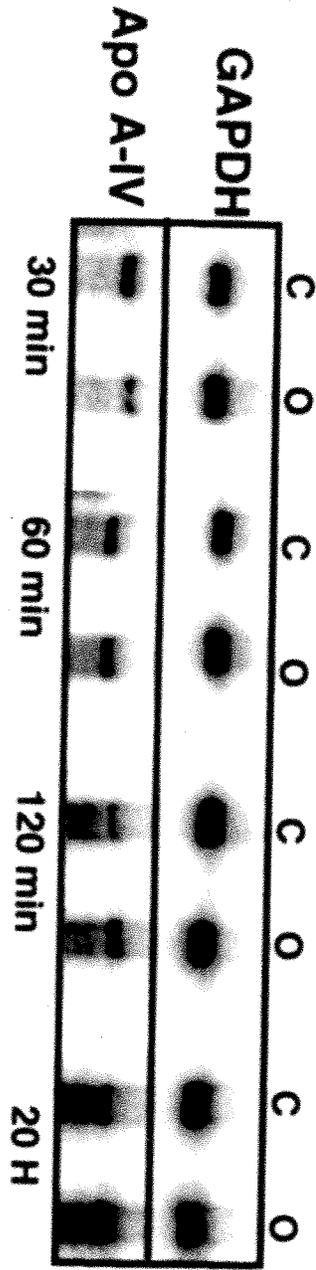
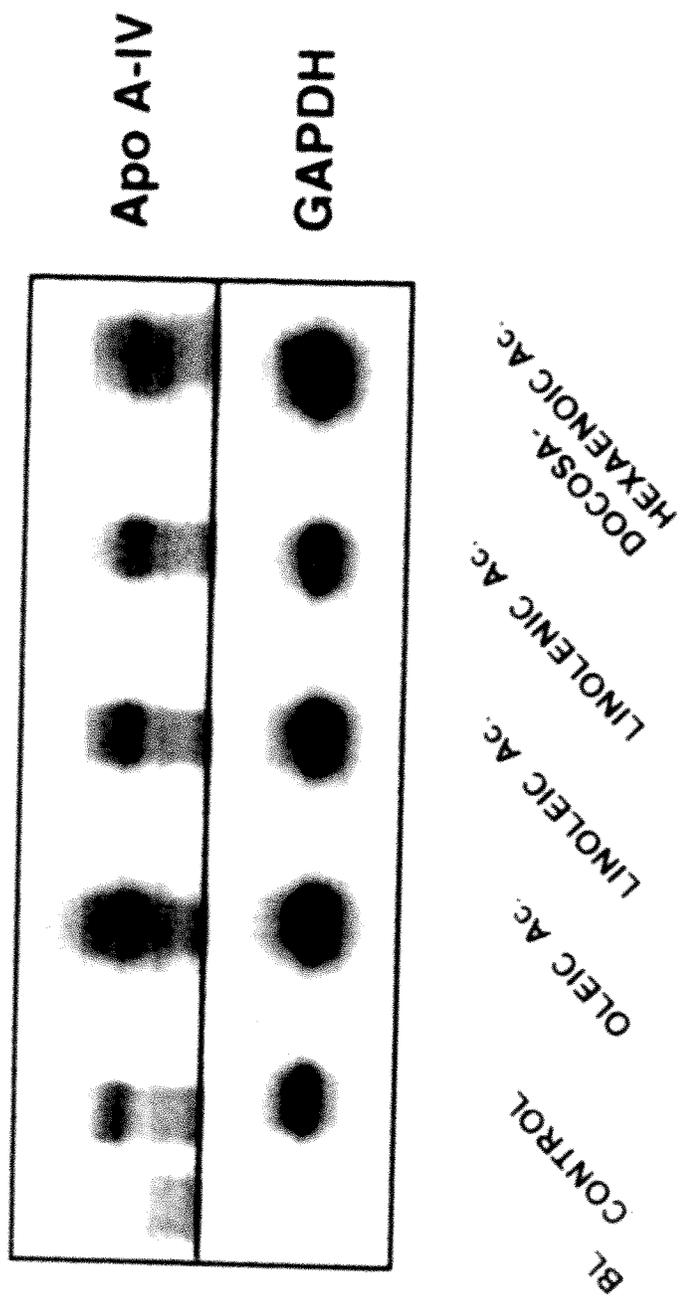


Figure 5.



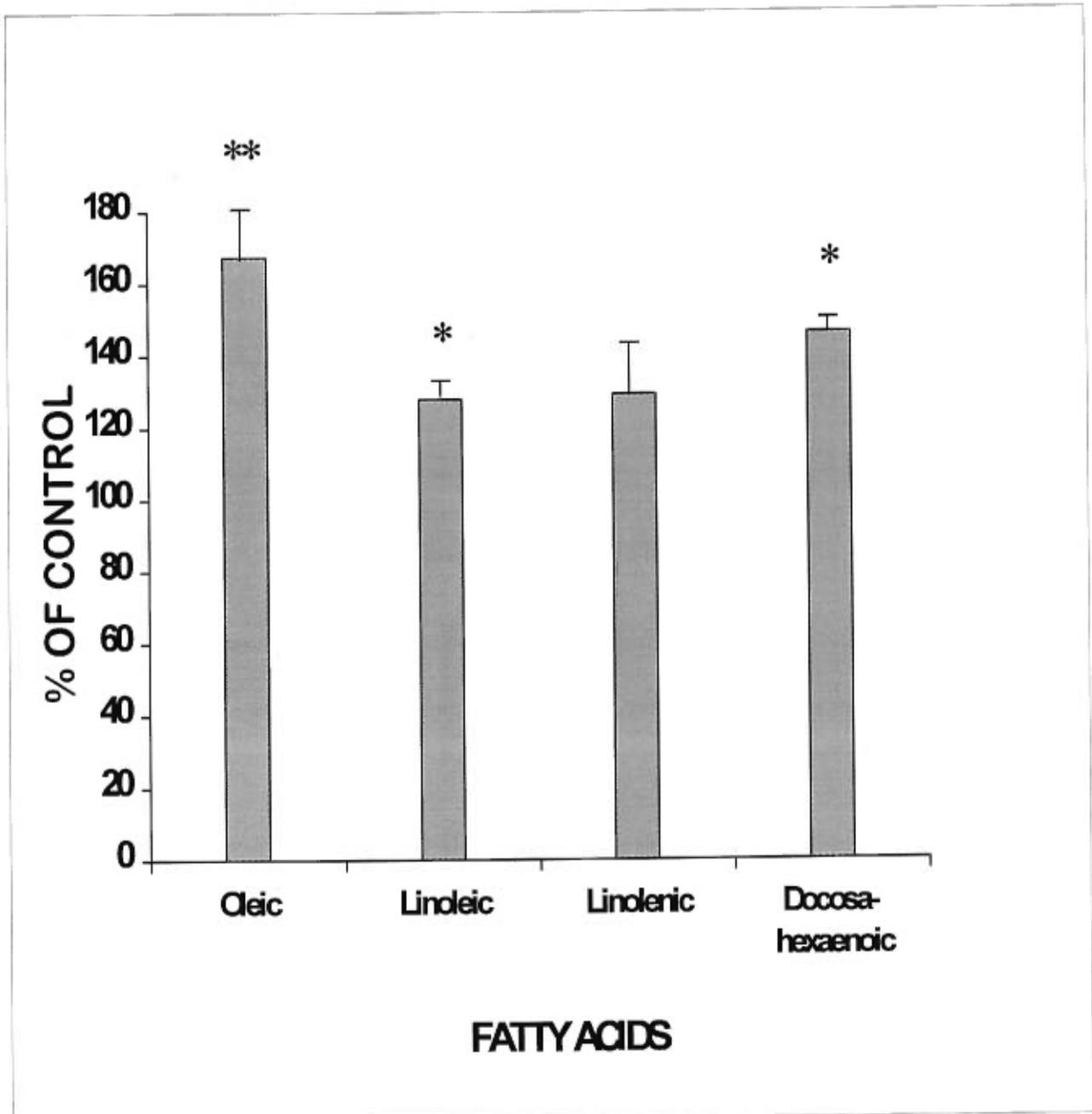


Figure 6

## Discussion

Nous avons procédé à une incubation des cellules Caco-2 avec les acides gras oléique (18:1 n-9), linoléique (18:2 n-6), linolénique (18:2 n-3) et docosahexaénoïque (22:6 n-3). Leur effet a été évalué à court (30 minutes) et à long (20 heures) terme et leur impact sur l'apo A-IV a été mesuré en fonction de trois paramètres: la concentration, la synthèse et les niveaux d'ARNm.

En ce qui concerne l'effet des acides gras ci-haut cités sur la teneur d'apo A-IV à l'intérieur du compartiment cellulaire, il se manifeste par une diminution unanime suite à l'incubation de 30 minutes. Cependant, à plus long terme, on assiste à une augmentation soutenue des niveaux d'apo A-IV dans ce compartiment. La présence d'apo A-IV dans le milieu, résultant de la somme du compartiment apical et basolatéral, à 30 minutes, est comparable à celle des contrôles, exception faite de l'acide docosahexaénoïque, qui induit une élévation. À plus long terme, les niveaux tendent vers une augmentation, surtout dans le cas des acides oléique et docosahexaénoïque. De manière globale, les niveaux d'apo A-IV sont abaissés suite à une incubation de courte durée (30 minutes), mais on assiste à une élévation de ces derniers après 20 heures. Un point important à mentionner est le fait que les acides oléique et docosahexaénoïque semblent exercer un effet plus prononcé que les deux autres acides gras, soient les acides linoléique et linolénique. L'étape sous-jacente régissant les niveaux d'apo A-IV étant la synthèse *de novo*, elle fut aussi déterminée, et ce, à l'aide de l'incorporation de [S<sup>35</sup>]-méthionine, d'immunoprécipitation et d'électrophorèse. Ainsi, suite à l'incubation de 30 minutes, la présence d'apo A-IV à l'intérieur des cellules est caractérisée par un abaissement démontrant une certaine uniformité à l'intérieur des classes d'acides gras. Par contre, à plus long terme, tous les acides gras induisent significativement la synthèse d'apo A-IV, tel qu'observé dans le compartiment cellulaire. En ce qui concerne la sécrétion dans le milieu d'apo A-IV nouvellement synthétisée, elle est également affectée par la présence d'acides gras. Globalement, on assiste à une inhibition de la synthèse à court terme et à une induction lors d'une incubation plus prolongée, ce qui confirme les premiers

résultats relatifs à la masse protéique. Une fois de plus, l'acide docosahexaénoïque se distingue par son plus grand impact.

L'étape ultime a été de vérifier si l'augmentation de la synthèse *de novo* et donc des niveaux d'apo A-IV étaient le fruit d'une régulation à l'échelle de l'expression génique. Ainsi, en déterminant les niveaux d'ARNm de l'apo A-IV par RT-PCR, une augmentation a été observée pour tous les acides gras, et ce, à 20 heures. Néanmoins, les acides oléique et docosahexaénoïque démontrent plus d'efficacité que les deux autres. À court terme (incubation de 30 minutes), l'acide oléique ne cause pas une élévation des niveaux d'ARNm, ce qui explique une faible synthèse *de novo* lors de cette période. En effet, c'est uniquement après 60 minutes que ces niveaux augmentent significativement et se maintiennent élevés jusqu'à 20 heures.

À la lumière de nos résultats, nous sommes en mesure d'affirmer que les acides gras sont en mesure d'induire la biogénèse de l'apo A-IV, ce qui confirme les observations décrites antérieurement. En effet, des travaux effectués autant *in vivo* (31,49,50,51,52) qu'*in vitro* (11) ont clairement souligné le lien étroit existant entre l'administration de lipides et la stimulation de l'expression génique, de la synthèse ainsi que de la sécrétion d'apo A-IV. De plus, l'impact des triglycérides d'origine alimentaire sur les niveaux d'apo A-IV a été étudié à maintes reprises, en administrant ces lipides soit par ingestion, soit par infusion gastrique ou intestinale. Dans l'ensemble des cas, l'administration de lipides a été accompagnée par une élévation des niveaux d'apo A-IV, tel que mesuré dans la lymphe ou le milieu sanguin (4,13,50). En outre, de nombreuses conditions caractérisées par une malabsorption lipidique, telles que l'abêtalipoprotéïnémie (10), la pancréatite chronique et les syndromes de malabsorption (53), et chez les sujets alimentés par voie parentérale (86) révèlent de faibles niveaux d'apo A-IV, ce qui confirme le rôle des lipides dans l'induction de cette protéine.

Tel que mentionné, nos résultats illustrent également qu'une incubation de 30 minutes représente une période insuffisante à l'induction de l'expression génique ou de la synthèse de l'apo A-IV. Ceci suggère la nécessité d'un certain laps de temps permettant l'assemblage et la sécrétion des chylomicrons, tel que suggéré par l'équipe du Dr.Tso (50). D'autres possibilités pourraient être

envisagées afin d'expliquer l'inhibition survenant lors de cette courte période: une faible concentration intracellulaire d'acides gras incapable de saturer les sites d'induction de l'expression génique de l'apo A-IV ou une instabilité de l'ARNm. Ce dernier point est particulièrement important puisqu'il a été prouvé, que les lipides sont à la base d'une régulation posttranscriptionnelle en augmentant la stabilité de l'ARNm (80). De plus, l'existence d'une séquence située au niveau du promoteur du gène de l'apo A-IV, sensible à la concentration intracellulaire d'acides gras a été révélée par Gordon et coll. (38).

Tel que mentionné précédemment, les acides oléique et docosahexaénoïque ont démontré un impact plus élevé sur la biogénèse de l'apo A-IV que les deux autres acides gras, mais les mécanismes expliquant ce phénomène demeurent inconnus. A ce niveau, il a été démontré que l'effet des huiles de poissons, source importante d'acide docosahexaénoïque, se traduit par une diminution de la sécrétion des triglycérides et d'apo B (65), ce qui suggère que c'est plutôt l'assemblage de la particule lipoprotéinique qui constituerait le stimulus et non sa sécrétion (38). Quant à l'acide oléique, il s'est avéré un stimulant très puissant de la synthèse *de novo* des triglycérides transportés par les lipoprotéines intestinales, et ce, en étant suivi, en ordre décroissant, par les acides linoléique, linolénique, palmitique et myristique (28), ce qui expliquerait son rôle dans la régulation de l'apo A-IV. L'ensemble de ces études a été effectué sur le même modèle que celui que nous avons utilisé, soit les cellules Caco-2, ce qui nous permet d'envisager ces possibilités. En ce qui a trait au rôle des acides gras à chaîne moyenne, tels que les acides caprylique (8:0) et caprique (10:0), des études supplémentaires seraient nécessaires afin de dissiper la controverse se rapportant à la modulation de l'apo A-IV. Les résultats permettraient ainsi d'explorer davantage les mécanismes impliqués dans l'induction de cette apolipoprotéine. En effet, tout en tenant compte de la voie de transport empruntée par les différentes classes d'acides gras, soit la veine porte pour les acides gras à chaîne moyenne en tant que composés libres liés à l'albumine (8) et le système lymphatique pour les acides gras à chaîne longue, (incorporés à l'intérieur des chylomicrons), on peut prévoir un effet nul sur les niveaux d'apo A-IV en présence de triglycérides à chaîne moyenne (MCT), et ce, en adoptant l'hypothèse selon

laquelle la formation des chylomicrons est indispensable à l'induction de cette dernière. Dans certains cas, l'effet des MCT sur la synthèse et la sécrétion lymphatique d'apo A-IV s'est avéré insignifiant, contrairement à celui des acides gras à chaîne longue (49). Par contre, des résultats contradictoires révèlent des effets similaires pour les deux types d'acides gras (12,66), ce qui suggère que la formation des chylomicrons à l'intérieur des entérocytes ne représente pas une étape obligatoire dans la biosynthèse de l'apo A-IV. Dans notre étude, la longueur de la chaîne carbonée n'a aucunement influencé la réponse de l'apo A-IV.

Dans le même ordre d'idées, lors de nos démarches expérimentales, l'impact du degré d'insaturation s'est avéré négligeable. Par exemple, l'acide oléique, avec un seul lien double, montrait plus de potentiel à induire l'apo A-IV que les acides linoléique (2 liens) et linoléinique (3 liens), mais l'envergure de son action est semblable à celle de l'acide docosahexaénoïque (6 liens). Ceci confirme les données obtenues par Palacios-Alaiz (71) qui a évalué l'impact des acides gras sur les niveaux d'ARNm hépatiques et par Tso (49), qui a testé leurs effets sur la sécrétion lymphatique d'apo A-IV.

Le rôle de l'acide docosahexaénoïque a été largement documenté à travers les effets des huiles de poissons dont il est une composante importante, et ce, dans de nombreuses maladies, telles que l'hyperlipidémie, la thrombose ou certaines maladies de nature inflammatoire. Les effets des huiles marines sur les niveaux plasmatiques des lipides se traduisent par une augmentation des niveaux de LDL (5-10%) et des HDL (1-3%) et par une diminution substantielle des triglycérides (25-30%). Le cholestérol, quant à lui, demeure inchangé par ce type de diète (43). De plus, les huiles de poissons ont été employées à titre de traitement dans des pathologies de nature inflammatoire, telles que l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin ou dans les cas d'agrégation excessive de plaquettes sanguines (34). Par ailleurs, de fortes concentrations d'acide docosahexaénoïque sont présentes au niveau des membranes phospholipidiques de la rétine et du cerveau (101). Ainsi, une déficience, telle que celle documentée chez les enfants prématurés (16) est liée à une faible acuité visuelle (9) et une capacité psychomotrice altérée (58).

En ce qui concerne l'acide oléique, de nombreuses études épidémiologiques ont démontré l'efficacité de l'huile d'olive, source principale de cet acide gras, dans le maintien d'une bonne santé cardio-vasculaire, ainsi que dans la prévention du développement de divers types de cancer, dont le cancer du sein (100). Les effets de cette huile se manifestent par une augmentation du cholestérol HDL et une diminution du LDL, ce qui est favorable à un profil lipidique adéquat. En effet, les vertus de la diète Méditerranéenne ne sont plus à prouver. Néanmoins, mise à part l'huile d'olive, cette diète est caractérisée par une forte consommation d'aliments d'origine végétale (fruits, légumes, céréales, légumineuses et noix), de produits laitiers (principalement sous forme de fromage et de yogourt), ainsi que de diverses variétés de poissons (111). Ses effets se traduisent, au sein de la population, par une faible incidence de maladies cardio-vasculaires, d'une multitude de cancers, d'obésité ainsi que par une longévité accrue. Ayant en vue ces effets bénéfiques, on suggère que les nouvelles recommandations nutritionnelles devraient être précisées davantage et mettre l'accent sur une plus forte consommation d'acide oléique et d'acides gras de la série n-3, dont l'acide docosahexaénoïque (20). Le fait que l'acide oléique stimule la synthèse d'apo A-IV souligne son rôle majeur en tant qu'agent anti-athérosclérotique. En effet, de récentes études ont pu documenter les effets protecteurs et bénéfiques de l'apo A-IV dans les maladies cardio-vasculaires. Cette protection peut être induite de plusieurs manières, soit par: l'activation de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines, telles que la LPL (36), la LCAT (52,94) ou la CETP (41) ou par la promotion de l'efflux du cholestérol périphérique (96). Par ailleurs, de très récents travaux ont conféré à cette apolipoprotéine le rôle d'antioxydant, agissant à travers l'induction de la paraoxonase (19) ou de manière directe (73).

Il est à préciser que le dénominateur commun des rôles de l'apo A-IV et des effets de ces deux acides gras vise une protection accrue vis-à-vis l'athérogénèse et le lien d'induction avec cette apolipoprotéine n'est nullement le fruit du hasard. En conclusion, tout en tenant compte des multiples rôles de l'apo A-IV, notamment en tant que facteur de protection vis-à-vis des maladies cardio-vasculaires et en tant que signal de satiété, il est important de constater qu'on

peut moduler l'expression génique et la synthèse de cette apolipoprotéine par l'ingestion de matières grasses et surtout par celle des acides oléique (sous forme d'huile d'olive) et docosahexaénoïque (sous forme d'huiles de poissons). Nos résultats permettent ainsi d'élargir le spectre d'action de ces deux acides gras qui ont été mis en évidence auparavant, pour leurs multiples effets bénéfiques.

## Références

- 1) **Aalto-Setälä, K., C.L. Bisgaier, A. Ho, K.A. Kieft, M.G. Traber, H.J. Kayden, R. Ramakrishnan, A. Walsh, A.D. Essenburg, and J.L. Breslow.** Intestinal Expression of Human Apolipoprotein A-IV in Transgenic Mice Fails to Influence Dietary Lipid Absorption or Feeding Behavior. J. Clin. Invest., 93: 1776-1786, 1994.
  
- 2) **Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson.** Cell Signaling, Molecular Biology of the Cell, Third Edition, chapter 15, 721-785, 1994.
  
- 3) **Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson.** Control of Gene Expression-Posttranscriptional Controls, Molecular Biology of the Cell, Third Edition, chapter 9, 453-468, 1994.
  
- 4) **Apfelbaum, T.F., N.O. Davidson, and R.M. Glickman.** Apolipoprotein A-IV synthesis in rat intestine: regulation by dietary triglyceride. Am. J. Physiol., 252: G662-G666, 1987.
  
- 5) **Apostolopoulos, J.J., M.J. La Scala, and G.J. Howlet.** The effect of triiodothyronine on rat apolipoprotein A-I and A-IV gene expression. BBRC., 154 (3): 997-1002, 1988.
  
- 6) **Assmann, G., A. von Eckardstein, and H. Funke.** High Density Lipoprotein, Reverse Transport of Cholesterol, and Coronary Artery Disease-Insights From Mutations. Circulation, 87 (Suppl. III): III28-III34, 1993.
  
- 7) **Auwerx, J., K. Schoonjans, J.C. Fruchart, and B. Staels.** Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. Atherosclerosis, 125 Suppl. S29-S37, 1996.
  
- 8) **Bach, A.C., and V.K. Babayan.** Medium-chain triglycerides: an update. Am. J. Clin. Nutr., 36:950-962, 1982.
  
- 9) **Bielka, H., B.L. Horecker, W.B. Jakoby, P. Karlson, B. Keil, C. Liébecq, B. Lindberg, and E.C. Webb.** Enzyme Nomenclature Recommendations (1978) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1979.
  
- 10) **Birch, E.E. et coll.** Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 33:3242-3253, 1992.
  
- 11) **Bisgaier, C.L., O.P. Sachdev, L. Megna, and R.M. Glickman.** Distribution of apolipoprotein A-IV in human plasma. J. Lipid. Res., 26: 11-25, 1985.

- 12) **Black, D.D., and H. Ellinas**, Apolipoprotein Synthesis in Newborn Piglet Intestinal Explants. Pediatr.Res., 32(5): 553-558, 1992.
- 13) **Black, D.D., H. Wang, F. Hunter, and R. Zhan**. Intestinal Expression of Apolipoprotein A-IV and C-III Is Coordinately Regulated by Dietary Lipid in Newborn Swine. BBRC., 221:619-624, 1996.
- 14) **Black, D.D., P.L. Rohwer-Nutter, and N.O. Davidson**. Intestinal apolipoprotein A-IV gene expression in the piglet. J. Lipid Res., 30:497-505, 1990.
- 15) **Bocos, C., M. Göttlicher, K. Gearing, C. Banner, E. Enmark, M. Teboul, A. Crickmore and J.-A. Gustafsson**. Fatty Acid Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR). J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 53: 467-473, 1995.
- 16) **Bovard-Houppermans, S.** L'apolipoprotéine A-IV humaine. Ann. Biol. Clin., 52:701-710, 1994.
- 17) **Carlson, S.E., P.G. Rhodes and M.G. Ferguson**. Docosahexaenoic acid status of preterm infants at birth and following feeding with human milk or formula. Am. J. Clin. Nutr., 44:798-804, 1986.
- 18) **Carrejo, M.H., A.R. Sharrett, W. Patsch, and E. Boerwinkle**. No Association of Apolipoprotein A-IV Codon 347 and 360 Variation With Atherosclerosis and Lipid Transport in a Sample of Mixed Hyperlipidemics. Genetic Epidemiol., 12: 371-380, 1995.
- 19) **Clarke, S. D. and S. Abraham**. Gene expression: nutrient control of pre- and posttranscriptional events. FASEB J., 6: 3146-3152, 1992.
- 20) **Cohen, R.D., L. W. Castellani, J.-H. Qiao, B.J. van Lenten, A.J. Lusis and K. Reue**. Reduced Aortic Lesions and Elevated High Density Lipoprotein Levels in Transgenic Mice Overexpressing Mouse Apolipoprotein A-IV. J. Clin. Invest., 99: 1906-1916, 1997.
- 21) **De Lorgenil, M., P. Salem, I. Monjand, and J. Delaye**. The 'diet heart' hypothesis in secondary prevention of coronary heart disease. Europ. Heart J., 18(1):13-18, 1997.
- 22) **Delamatre, J. G. and P. S. Roheim**. The Response of Apolipoprotein A-IV to Cholesterol Feeding in Rats. BBA., 751: 210-217, 1983.
- 23) **Duvenger, N., G. Tremp, J.-M. Caillaud, F. Emmanuel, G. Castro, J.-C. Fruchart, A. Steinmetz, and P. Denèfle**. Protection Against Atherogenesis in Mice Mediated by Human Apolipoprotein A-IV. Science, 273:966-968, 1996.
- 24) **Dvorin, E., N.L. Gorder, D.M. Benson, and A.M. Gotto Jr.** Apolipoprotein A-IV. A determinant for binding and uptake of high density lipoproteins by rat hepatocytes. J.Biol.Chem., 261: 15714-15718, 1986.

- 25) Elshourbagy, N. A., D. W. Walker, Y.-K. Paik, M. S. Boguski, M. Freeman, J. I. Gordon, and J.M. Taylor. Structure and Expression of the Human Apolipoprotein A-IV Gene. J.Biol.Chem., 267, 17: 7973-7981, 1987.
- 26) Elshourbagy, N.A., M.S. Boguski, W.S.L. Liao, L.S. Jefferson, J.I. Gordon, and J.M. Taylor. Expression of rat apolipoprotein A-IV and A-I genes: mRNA induction during development and in response to glucocorticoids and insulin. Proc. Natl. Acad. Sci., 82:8242-8246, 1985.
- 27) Etienne, J., Synthèse des protéines-Transcription chez les eucaryotes, Abrégés: Biochimie génétique. Biologie moléculaire, 3<sup>e</sup> édition, 84-99, 1996.
- 28) Felgines, C., A. Mazur, and Y. Rayssiguier. Effect of the Interruption of Enterohepatic Circulation of Bile Acids by Cholestyramine on Apolipoprotein Gene Expression in the Rat. Life Sciences, 55: 1053-1060, 1994.
- 29) Field, F.J., E. Albright, and S.N. Mathur. Regulation of triglyceride-rich lipoprotein secretion by fatty acids in CaCo-2 cells. J. Lipid. Res., 29:1427-1437, 1988.
- 30) Fujimoto, K., H. Machidori, R. Iwakiri, K. Yamamoto, J. Fujisaki, T. Sakata and P. Tso. Effect of intravenous administration of apolipoprotein A-IV on patterns of feeding, drinking and ambulatory activity of rats. Brain Res., 608: 233-237, 1993.
- 31) Fujimoto, K., K. Fukagawa, T. Sakata, and P. Tso. Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system. J. Clin. Invest., 91: 1830-3, 1993.
- 32) Fujimoto, K., J.A. Cardelli, and P. Tso. Increased apolipoprotein A-IV in rat mesenteric lymph after lipid meal acts as a physiological signal for satiation. Am. J. Physiol., 262: G1002-G1006, 1992.
- 33) Fukagawa, K., H.-M. Gou, R. Wolf, and P. Tso. Circadian rhythm of serum and lymph apolipoprotein A-IV in ad libitum-fed and fasted rats. Am. J. Physiol., 267: R1385-R1390, 1994.
- 34) Fusco, B.M., and M. Giacovazzo. Peppers and pain. the promise of capsaicin. Drugs, 53(6): 909-914, 1997.
- 35) Gerster, H. The use of n-3 PUFAs (fish oil) in enteral nutrition (Review). Inter. J. Vit. & Nutr. Res., 65(1):3-20, 1995.
- 36) Ghiselli, G., W.L. Crump III, R. Musanti, B.C. Sherrill and A.M. Gotto Jr. Metabolism of apolipoprotein A-IV in rat. Biochim.Biophys.Acta, 1006:26-34, 1989.

- 37) **Goldberg, I.J., C.A. Scheraldi, L.K. Yacoub, U. Saxena, and C.L. Bisgaier.** Lipoprotein ApoC-II Activation of Lipoprotein Lipase-Modulation by Apolipoprotein A-IV. J. Biol. Chem., 265: 4266-4272, 1990.
- 38) **Gordon, J. I., C.L. Bisgaier, H.F. Sims, O.P. Sachdev, R. M. Glickman and A. W. Strauss.** Biosynthesis of Human Preapolipoprotein A-IV. J. Biol. Chem., 259: 468-474, 1984.
- 39) **Gordon, J. I., D.P. Smith, D.H. Alpers, and A.W. Strauss.** Cloning of a Complementary Deoxyribonucleic Acid Encoding a Portion of Rat Intestinal Preapolipoprotein A-IV Messenger Ribonucleic Acid. Biochemistry, 21:5424-5431, 1982.
- 40) **Granner, D.K.,** Régulation de l'expression génique. Précis de biochimie, 8<sup>e</sup> édition, Chapitre 41, 493-512, 1995.
- 41) **Grundy, S.M.,** Cholesterol and Atherosclerosis-Diagnosis and Treatment, Cholesterol transport, 1.7-1.23, 1990.
- 42) **Guyard-Dangremont, V., L. Lagrost, and P. Gambert.** Comparative effects of purified apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV on cholesteryl ester transfer protein activity. J. Lipid Res., 35: 982-992, 1994.
- 43) **Hanis, C.L., T.C. Douglas, and D. Hewett-Emmett.** Apolipoprotein A-IV protein polymorphism: frequency and effects on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins among Mexican-Americans in Starr County, Texas. Hum. Genet., 86: 323-325, 1991.
- 44) **Harris, W.** n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. Am. J. Clin. Nutr., 65(5) Suppl. 1645S-1654S, 1997.
- 45) **Hayashi, H., D.F. Nutting, K. Fujimoto, J.A. Cardelli, D. Black, and P. Tso.** Transport of lipid and apolipoprotein A-I and A-IV in intestinal lymph of the rat. J. Lipid Res., 31: 1613-1625, 1990.
- 46) **Heinecke, J.W. and A.J. Lusis.** Paraoxonase-Gene Polymorphisms Associated with Coronary Heart Disease: Support for the Oxidative Damage Hypothesis? Am. J. Hum. Genet., 62:20-24, 1998.
- 47) **Horn, C.C., M.G. Tordoff, and M.I. Friedman.** Does ingested fat produce satiety? Am. J. Physiol., 270: R761-R765, 1996.
- 48) **Jansen, S., J. Lopez-Miranda, J. Salas, J. M. Ordovas, P. Castro, C. Marin, M. A. Ostos, F. Lopez-Segura, J. A. Jimenez-Pereperez, A. Blanco, and F. Perez-Jimenez.** Effects of 347-Serine Mutation in Apolipoprotein A-IV on Plasma LDL Cholesterol Response to Dietary Fat. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17: 1532-1538, 1997.

- 49) **Kalogeris, T. J., F. Monroe and P. Tso.** Stimulation of intestinal apolipoprotein A-IV by lipid is independent of capsaicin-sensitive afferent signals. Am. J. Physiol., 273: R981-990, 1997.
- 50) **Kalogeris, T. J., F. Monroe S. J. Demichele and P. Tso.** Intestinal Synthesis and Lymphatic Secretion of Apolipoprotein A-IV Vary with Chain Length of Intestinally Infused Fatty Acids in Rats. J. Nutr., 126:2720-2729, 1996.
- 51) **Kalogeris, T. J., K. Fukagawa, and P. Tso.** Synthesis and lymphatic transport of intestinal apolipoprotein A-IV in response to graded doses of triglyceride. J. Lipid. Res., 35: 1141-1151, 1994.
- 52) **Kalogeris, T. J., T. Tsuchiya, K. Fukagawa, R. Wolf, and P. Tso.** Apolipoprotein A-IV synthesis in proximal jejunum is stimulated by ileal lipid infusion. Am. J. Physiol., 270: G277-G286, 1996.
- 53) **Kalogeris, T.J., M-D. Rodriguez and P. Tso.** Control of Synthesis and Secretion of Intestinal Apolipoprotein A-IV by Lipid. J. Nutr., 127: 537S-543S, 1997.
- 54) **Koga, S., Y. Miyata, A. Funakoshi, and H. Ibayashi.** Plasma apolipoprotein A-IV levels decrease in patients with chronic pancreatitis and malabsorption syndrome. Digestion., 32:19-24, 1985.
- 55) **Lévy, É., M. Mehran, and E. Seidman.** Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. FASEB J., 9: 626-635, 1995.
- 56) **Lagrost, L., P. Gambert, V. Dangremont, A. Athias, and C. Lallemant.** Role of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in the HDL conversion process as evidenced by using anti-CETP monoclonal antibodies. J. Lipid. Res., 31: 1569-1575, 1990.
- 57) **Latruffe, N., and J. Vamecq.** Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. Biochimie, 79: 81-94, 1997.
- 58) **Lin-Lee, Y.-C., W. Strobl, S. Soyak, M. Radosavljevic, M. Song, A. M. Gotto, Jr., and W. Patsch.** Role of thyroid hormone in the expression of apolipoprotein A-IV and C-III genes in rat liver. J. Lipid Res., 34:249-259, 1993.
- 59) **Lucas, A. et coll.** Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. Lancet, 339:261-264, 1992.
- 60) **Mayes, P.A. ,** Transport et emmagasinage des lipides. Précis de biochimie, 8<sup>e</sup> édition, Chapitre 27, 285-303, 1995.
- 61) **Mayes, P.A.,** Digestion et absorption. Précis de biochimie, 8<sup>e</sup> édition, Chapitre 55, 696-710, 1995.

- 62) Mayes, P.A.**, Synthèse, transport et excrétion du cholestérol. Précis de biochimie, 8<sup>e</sup> édition, Chapitre 28, 304-318, 1995.
- 63) McCombs, R. J., D. E. Maracadis, J. Ellis and R.B. Weinberg.** Attenuated Hypercholesterolemic Response to a High-Cholesterol Diet in Subjects Heterozygous for the Apolipoprotein A-IV-2 Allele. N. Engl. J. Med., 331:706-710, 1994.
- 64) Merrill, A.H.** *Apo A-IV: A New Satiety Signal*. Nutrition Reviews. 51: 273-275, 1993.
- 65) Mezdour, H., T. Yamamura, S. Nomura, A. Yamamoto.** Genetic but not diet-induced hypercholesterolemia causes low apolipoprotein A-IV level in rabbit sera. Atherosclerosis, 113: 171-178, 1995.
- 66) Murthy, S., E. Albright, S.N. Mathur, N.O. Davidson, and F.J. Field.** Apolipoprotein B mRNA Abundance Is Decreased by Eicosapentaenoic Acid in CaCo-2 Cells. Arterioscl. and Thromb., 12:691-700, 1992.
- 67) Nishimura, M., M. Seishima, H. Ohashi, and A. Noma.** Effects of lipid administration on lymphatic apolipoprotein A-IV and B output and synthesis. Am. J. Physiol., 271: G322-G329, 1996.
- 68) Ochoa, A., S. Bovard-Houppermans and M.M. Zakin.** Human apolipoprotein A-IV gene expression is modulated by members of the nuclear hormone receptor superfamily Biochim. Biophys. Acta, 1210: 41-47, 1993.
- 69) Ohta, T., N.H. Fidge, and P. Nestel.** Studies on the In Vivo and In Vitro Distribution of Apolipoprotein A-IV in Human Plasma and Lymph. J. Clin. Invest., 76: 1252-1260, 1985.
- 70) Okumura, T., I.L. Taylor, K. Fukagawa, P. Tso and T.N. Pappas.** Apolipoprotein A-IV acts centrally in the brain to reduce the severity of gastric ulceration in the rat. Brain Res., 673: 153-156, 1995.
- 71) Okumura, T., K. Fukagawa, P. Tso, I.L. Taylor and T.N. Pappas.** Mechanism of Action of Intracisternal Apolipoprotein A-IV in Inhibiting Gastric Acid Secretion in Rats. Gastroenterology, 109: 1583-1588, 1995.
- 72) Osada, J., A. Fernandez-Sanchez, J. L. Diaz-Morillo, M. J. Miro-Obradors, J. A. Cebrian, C. Carrizosa, J. M. Ordovas and E. Palacios-Alaiz.** Differential effect of dietary fat saturation and cholesterol on hepatic apolipoprotein gene expression in rats. Atherosclerosis, 108: 83-90, 1994.
- 73) Ponsin, G.** Rôle des lipoprotéines de haute densité (HDL) dans la voie de retour du cholestérol. Diabete Metab., 17: 319-324, 1991.

- 74) Qin, X., D.K. Swertfeger, S. Zheng, D.Y. Hui, and P. Tso. Apolipoprotein A-IV: a potent endogenous inhibitor of lipid oxidation. Am. J. Physiol., 274:H1836-H1840, 1998.
- 75) Rader, D.J., J. Schäfer, P. Lohse, B. Verges, M. Kindt and L.A. Zech. Rapid In Vivo Transport and Catabolism of Human Apolipoprotein A-IV-1 and Slower Catabolism of the Apo A-IV-2 Isoprotein. J. Clin. Invest., 92: 1009-1017, 1993.
- 76) Radosavljevic, M., Y.-C. Lin-Lee, S. M. Soyala, W. Strobl, C. Seelos, A. M. Gotto, Jr. and W. Patsch. Effect of sucrose diet on expression of apolipoprotein genes A-I, C-III and A-IV in rat liver. Atherosclerosis, 95: 147-156, 1992.
- 77) Reue, K., D.A. Purcell-Huynh, T. H. Leete, and A.J. Lusis. Genetic Variation in apo A-IV mRNA Levels in Controlled Post-Transcriptionally by a Combination of cis- and trans- Acting Regulatory Elements. Circulation, 82:4, III-4, 1990.
- 78) Reue, K., D.A. Purcell-Huynh, T. H. Leete, M. H. Doolittle, A. Durstenfeld, and A.J. Lusis. Genetic variation in mouse apolipoprotein A-IV expression is determined pre- and post-transcriptionally. J. Lipid Res., 34: 893-903, 1993.
- 79) Sakata, Y., K. Fujimoto, S.-I. Ogata, T. Koyama, K. Fukagawa, T. Sakai, and P. Tso. Postabsorptive factors are important for satiation in rats after a lipid meal. Am. J. Physiol., 271: G438-G442.
- 80) Sanchez-Pozo, A., M. Ramirez, A. Gil, J. Maldonado, J.P. van Biervliet, and M. Rosseneu. Dietary Nucleotides Enhance Plasma Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Activity and Apolipoprotein A-IV Concentration in Preterm Newborn Infants. Pediatr. Res., 37: 328-333, 1995.
- 81) Sato, M., K. Imaizumi, H. Mori, and M. Sugano. Regulation of intestinal apo A-IV mRNA abundance in rat pups during fasting and refeeding. BBA., 1165: 93-101, 1992.
- 82) Satoh, M., K. Nagao, T. Hayami, M. Sugano, and K. Imaizumi. Repression of Fat-Dependent Intestinal Apo A-IV mRNA Abundance by Medium Chain Triacylglycerols and Proteins, and Elevation by Carbohydrates of Fat-Dependent Apo A-IV Transport in Suckling Rat Pups. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 41: 293-306, 1995.
- 83) Schaefer, E. J., S. Lamon-Fava, L. M. Ausman, J. M. Ordovas, B. A. Clevidence, J. T. Judd, B. R. Goldin, M. Woods, S. Gorbach, and A. H. Lichtenstein. Individual variability in lipoprotein cholesterol response to National Cholesterol Education Program Step 2 diets. Am. J. Clin. Nutr., 65: 823-30, 1997.
- 84) Schoonjans, K., B. Staels, and J. Auwerx. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. J. Lipid. Res., 37: 907-925, 1996.

- 85) Seishima M. and A. Noma.** Compensatory Increase in Intestinal Apolipoprotein A-IV mRNA Levels in the Experimental Nephrotic Rat. Metabolism, 42: 1375-1380, 1993.
- 86) Serougne, C., C. Felgines, J. Férézou, T. Hajri, C. Bertin and A. Mazour.** Hypercholesterolemia Induced by Cholesterol- or Cystine-Enriched Diets Is Characterized by Different Plasma Lipoprotein and Apolipoprotein Concentrations in Rats. J. Nutr., 125: 35-41, 1995.
- 87) Sherman, J.R. and R.B. Weinger.** Serum apolipoprotein A-IV and lipoprotein cholesterol in patients undergoing total parenteral nutrition. Gastroenterology, 95:394-401, 1988.
- 88) Sonoyama, K., H. Nishikawa, S. Kiriya and R. Niki.** Bile Diversion Lowers Apolipoprotein A-I and A-IV mRNA Levels in Rat Ileum. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 40:343-352, 1994
- 89) Sonoyama, K., H. Nishikawa, S. Kiriya and R. Niki.** Cholestyramine and a Fat-Free Diet Lower Apolipoprotein A-IV mRNA in Jejunum and Cholestyramine Lowers Apolipoprotein A-I mRNA in Ileum of Rats. J. Nutr., 124: 621-627, 1994
- 90) Sonoyama, K., R. Fujiwara, and Y. Aoyama.** Stimulating Effect of Ileal Pancreaticobiliary Secretion on Ileal Apolipoprotein A-IV mRNA Expression in Fasted Rats. Biosci. Biotech. Biochem., 61:887-889, 1997
- 91) Staels, B., A. van Tol, G. Verhoeven, and J. Auwerx.** Apolipoprotein A-IV Messenger Ribonucleic Acid Abundance Is Regulated in a Tissue-Specific Manner. Endocrinology, 126: 2153-2163, 1990.
- 92) Staels, B., A. van Tol, L. Chan, G. Verhoeven, and J. Auwerx.** Variable effects of Different Corticosteroids on Plasma Lipids, Apolipoproteins, and Hepatic Apolipoprotein mRNA Levels in Rats. Arteriosclerosis and Thrombosis., 11: 760-769, 1991.
- 93) Staels, B., A. van Tol, T. Andreu, and J. Auwerx.** Fibrates Influence the Expression of Genes Involved in Lipoprotein Metabolism in a Tissue-Selective Manner in the Rat. Arteriosclerosis and Thrombosis, 12: 286-294, 1992.
- 94) Staels, B., K. Schoonjans, J.C. Fruchart, and J. Auwerx.** The effects of fibrates and thiazolidinediones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). Biochimie, 79: 95-99, 1997.
- 95) Steinmetz, A. and G. Utermann.** Activation of Lecithin:Cholesterol Acyltransferase by Human Apolipoprotein A-IV. J. Biol. Chem., 260: 2258-2264, 1985.

- 96) Steinmetz, A., P. Czekelius, E. Thiemann, S. Motzny, and H. Kaffarnik.** Changes of apolipoprotein A-IV in the human neonate: evidence for different inductions of apolipoproteins A-IV and A-I in the postpartum period. Atherosclerosis, 69: 21-27, 1988.
- 97) Steinmetz, A., R. Barbaras, N. Ghalim, V. Clavey, J.-C. Fruchart and G. Ailhaud** Human Apolipoprotein A-IV Binds to Apolipoprotein A-I/A-II Receptor Sites and Promotes Cholesterol Efflux from Adipose Cells. J. Biol. Chem., 265:7859-7863, 1990.
- 98) Strobl, W., B. Knerer, R. Gratzl, K. Arbeiter, Y.-C. Lin-Lee, and W. Patsch.** Altered Regulation of Apolipoprotein A-IV Gene Expression in the liver of the Genetically Obese Zucker Rat. J. Clin. Invest., 92: 1766-1773, 1993.
- 99) Surh, Y.J., and S.S. Lee.** Capsaicin in hot chili pepper:carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? Food and Chem. Toxicology, 34(3):313-316, 1996.
- 100) Tso, P., Q. Chen, K. Fujimoto, K. Fukagawa, and T. Sakata.** Apolipoprotein A-IV: A Circulating Satiety Signal Produced by the Small Intestine. Obes. Res., 3 (Suppl 5): 689S-695S, 1995.
- 101) Ttrichopoulou, A., and P. Lagiou.** Worldwide patterns of dietary lipids intake and health implications (Review). Am. J. Clin. Nutr., 66(4 Suppl): 961S-964S, 1997.
- 102) Uauy, R.D., Birch D.G., Birch E.E., Tyson J.E. and Hoffman D.R.** Effect of Dietary Omega-3 Fatty Acids on Retinal Function of Very-Low-Birth-Weigh Neonates. Pediatr. Res. 28: 489-492, 1990.
- 103) Uchida, E., A. Masumoto, S. Sakamoto, S. Koga and H. Nawata.** Effect of insulin, glucagon or dexamethasone on the production of apolipoprotein A-IV in cultured rat hepatocytes. Atherosclerosis. 87:195-202, 1991.
- 104) Vander, A.J., J.H. Sherman, D.S. Luciano et J.R. Gontier.** Digestion et absorption des aliments, Physiologie humaine, deuxième édition, 455-497, 1989.
- 105) Vergès, B., D. Rader, J. Schaefer, L. Zech, M. Kindt, T. Fairwell, P. Gambert, and B. Brewer, Jr.** In vivo metabolism of apolipoprotein A-IV in severe hypertriglyceridemia: a combined radiotracer and stable isotope kinetic study. J. Lipid. Res., 35: 2280-2291, 1994.
- 106) Vergès, B.L., G. Vaillant, A. Goux, L. Lagrost, J.M. Brun and P. Gambert.** Apolipoprotein A-IV Levels and Phenotype Distribution in NIDDM. Diabetes Care, 17(8): 810-817, 1994.
- 107) Vergès, B.L., L. Lagrost, G. Vaillant, J.M. Petit, M. Cohen, P. Gambert, and J.M. Brun** Cardiovascular Disease Is Associated With Increased Plasma apolipoprotein A-IV Levels in NIDDM. Diabetes, 46:125-132, 1997.

- 108) Visvikis, S., J. Steinmetz, E. Boerwinkle, R. Gueguen, M.-M. Galteau and G. Siest.** Frequency and effects of the apolipoprotein A-IV polymorphism. Clinical Genetics, 36: 435-441, 1989.
- 109) Weinberg, R. B. and M. S. Spector.** Structural Properties and Lipid Binding of Human Apolipoprotein A-IV. J. Biol. Chem., 260:4914-4921, 1985.
- 110) Weinberg, R. B., A. I. Jamal and M. C. Phillips.** Adsorption of Apolipoprotein A-IV to Phospholipid Monolayers Spread at the Air/ Water Interface. J. Biol. Chem., 267:8977-8983, 1992.
- 111) Weinstock, P.H., C.L. Bisgaier, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, E. Sehayek, L. Wu, P. Sheiffele, M. Merkel, A.D. Essenburg, and J.L. Breslow.** Decreased HDL cholesterol levels but normal lipid absorption, growth, and feeding behaviour in apolipoprotein A-IV knockout mice. J. Lipid Res., 38: 1782-1794, 1997.
- 112) Willett, W.C., F. Sacks, A. Trichopoulou, G. Drescher, A. Ferro-Luzzi, E. Helsing, and D. Trichopoulos.** Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating (Review). Am. J. Clin. Nutr., 61(6 Suppl): 1402S-1406S, 1995.
- 113) Williams, S. C., S. G. Grant, K. Reue, B. Carrasquillo, A. J. Lusis and A. J. Kinniburgh.** Cis-Acting Determinants of Basal and Lipid-regulated Apolipoprotein A-IV Expression in Mice. J. Biol. Chem., 264: 19009-19016, 1989.
- 114) Wolf, G.** Fatty Acids Bind Directly to and Activate Peroxisome Proliferator-activated Receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . Nutrition Reviews, 56: 61-63, 1998.
- 115) Zaiou, M., S. Visvikis, A. Visvikis, and G. Siest.** A rapid and reliable method for direct genotyping of codon 360 in the human apolipoprotein A-IV gene. J. Lipid. Res., 33: 1061-1066, 1992.
- 116) Zaiou, M., S. Visvikis, R. Gueguen, H.-J. Parra, J.C. Fruchart, and G. Siest.** DNA polymorphism of human apolipoprotein A-IV gene: frequency and effects on lipid, lipoprotein and apolipoprotein levels in a French population. Clin. Genet., 46: 248-254, 1994.

## **Remerciements**

Permettez-moi tout d'abord d'exprimer mes remerciements les plus sincères à mon directeur de recherche, le Dr. Emile Levy, ainsi qu'à mon codirecteur, le Dr. Edgard Delvin. Leur expertise et leur soutien inconditionnel ont représenté des éléments essentiels à la réussite de ce projet, en me permettant d'acquérir une discipline et des aptitudes indispensables au travail de recherche. Par ailleurs, je tiens à mentionner la précieuse collaboration de chacun des membres de l'équipe du Dr. Levy, dont l'aide et les conseils ont été grandement appréciés.