

50376

1991

14

66370

50376

1991

14

Université des Sciences et Techniques
de Lille Flandres-Artois

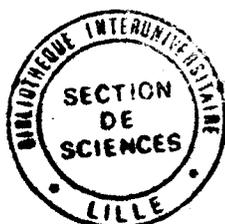
Thèse de Doctorat d'Université

N° d'ordre 682

Présentée par

Sophie DELATTRE

**Etude clinique, biologique et
cellulaire de différents cas
d'hypercholestérolémie**



Soutenu le 1^{er} Février 1991

devant le Jury :

Professeur André Verbert	Président
Professeur Jean-Charles Fruchart	Examineur
Professeur Geneviève Spik	Rapporteur
Professeur Christiane Delbart	Examineur
Professeur Patrick Duriez	Rapporteur
Docteur Véronique Clavey	Examineur

A Franck,
A mes Parents,

Je tiens à remercier les membres de mon Jury :

Madame le Docteur Véronique Clavey,

Vous avez guidé mes premiers pas dans la recherche. J'ai toujours pu apprécier vos compétences scientifiques. La confiance que vous m'avez témoignée m'a beaucoup aidée. Trouvez dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jean-Charles Fruchart,

Vous m'avez accueillie au SERLIA et donné le goût de la recherche. Soyez assuré de ma vive reconnaissance.

Monsieur le Professeur André Verbert,

Vous me faites l'honneur de présider le Jury de cette thèse et ce malgré vos multiples nouvelles charges. Je vous en remercie vivement.

Madame le Professeur Christiane Delbart,

Je suis très heureuse de vous compter parmi les membres de ce Jury. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Patrick Duriez,

J'ai toujours pu apprécier votre grande gentillesse. Je suis très honorée que vous ayiez accepté de juger ce travail. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Madame le Professeur Geneviève Spik,

Je vous remercie vivement d'avoir accepté si spontanément de juger ce travail.

L'exposé de mon travail me donne l'occasion de remercier tous les membres du SERLIA et plus particulièrement **Pierre** sur lequel j'ai toujours pu compter et dont l'aide efficace m'a été très précieuse.

Ce travail a été réalisé au Service de Recherche sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose (SERLIA) - Unité INSERM 325 dirigé par le Professeur Jean-Charles Fruchart (Institut Pasteur de LILLE).

Publications internationales

Interaction of LpB, LpB:E, LpB:C-III and LpB:C-III:E lipoproteins with the LDL receptor on HeLa cells.

AGNANI G., BARD J.-M., CANDELIER L., **DELATTRE S.**, FRUCHART J.-C., CLAVEY V.

Arteriosclerosis, accepté pour publication, 1991.

Characterization of some apoB containing particles - clinical significance and pharmacological modulation.

BARD J.-M., AGNANI G., CANDELIER L., **DELATTRE S.**, CLAVEY V., PARRA H.-J., FRUCHART J.-C.,

International Symposium on the Chemistry, Metabolism and Clinical Aspects of Lipoprotein Particles - Oklahoma City, sous presse.

LDL receptor deficiency determined on Epstein-Barr virus transformed lymphocytes.

DELATTRE S., CLAVEY V., KING-UNDERWOOD L., KUSNIERZ J.-P., HUMPHRIES S., FRUCHART J.-C.

Methods in Molecular and Cellular Biology, accepté pour publication, 1991.

Six DNA polymorphisms in the low density lipoprotein receptor gene : their genetic relationship and an example of their use for identifying affected relatives of patients with familial hypercholesterolemia.

HUMPHRIES S., KING-UNDERWOOD L., GUDNASON V., SEED M., **DELATTRE S.**, CLAVEY V., FRUCHART J.-C.

Hum. Gen., soumis pour publication.

Comparison of lipoprotein profiles from LDL receptor deficient and non deficient hypercholesterolemic patients. Evolution with fenofibrate or simvastatin treatment.

BENHAMAMOUCHE S., **DELATTRE S.**, AGNANI G., BILLARDON C., BARD J.-M., KUSNIERZ J.-P., LUC G., DEGENNES J.-L., FRUCHART J.-C., CLAVEY V.

Metabolism, soumis pour publication.

Articles didactiques et publications nationales

Structure et métabolisme des lipoprotéines plasmatiques.

CLAVEY V., DELATTRE S.

Le Moniteur de l'Internat, sous presse.

Analyse des récepteurs LDL des lymphocytes par immunocytofluorimétrie indirecte.

CLAVEY V., BENHAMAMOUCHE S., DELATTRE S., FRUCHART J.-C.

Immunoanal. Biol. Spéc., 1990, 24 : 37-40.

Communications affichées

Dosage des récepteurs des LDL sur lymphocytes humains par immunocytofluorimétrie indirecte.

BENHAMAMOUCHE S., DELATTRE S., MARZIN D., FRUCHART J.-C., CLAVEY V.

"Lipoprotein and Phospholipase - Present and Future", Paris, 14-16 Septembre 1988.

LDL receptor deficiency determined on lymphocytes and on skin fibroblasts in six hypercholesterolaemic families.

DELATTRE S., BENHAMAMOUCHE S., FARRIAUX J.-P., FRUCHART J.-C., CLAVEY V.

55th Annual meeting of the European Atherosclerosis Society, Brugge, 17-19 Mai 1990.

Dosage du LDL récepteur sur lignées lymphocytaires transformées. Application à la recherche de liaison entre le marqueur génétique et l'expression phénotypique.

DELATTRE S., KING-UNDERWOOD L., GUDNASON V., HUMPHRIES S., FRUCHART J.-C., CLAVEY V.

XVII Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Villeneuve d'Ascq, 3-6 Juillet 1990.

Résumé

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires. Les travaux de Goldstein et Brown ont permis d'élucider les bases génétiques de l'hypercholestérolémie familiale (FH), maladie à transmission autosomale dominante qui se caractérise par une modification du gène du récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDL). Ceci conduit à la traduction d'une protéine dont la déficience peut être évaluée par son phénotype fonctionnel. L'étude fonctionnelle peut être réalisée sur les cellules prélevées chez les malades : fibroblastes et lymphocytes.

Après l'établissement des protocoles d'étude de l'activité des récepteurs LDL de différents types cellulaires (cellules HeLa, fibroblastes, lymphocytes, lymphocytes transformés par le virus Epstein-Barr, cellules U937 et monocytes-macrophages), nous avons sélectionné des familles et des sujets dans une étude de population dont le bilan lipidique est comparable à celui de sujets hétérozygotes FH.

Nous avons montré que, chez certains sujets, l'hypercholestérolémie peut être due à un déficit en récepteurs LDL (FH) et/ou à une déficience au niveau de l'apolipoprotéine B des LDL.

Les cellules de patients, cependant classés cliniquement et biologiquement hétérozygotes FH, ont une expression normale des récepteurs LDL. Sous traitement hypocholestérolémiant, l'évolution de leur bilan lipidique est comparable à celle de patients FH déficients en récepteurs LDL, suggérant une forte inhibition *in vivo* de leurs récepteurs LDL, probablement due à des perturbations acquises ou génétiques de la régulation.

Nos résultats montrent l'importance d'études génétiques associées à l'étude fonctionnelle, afin d'approfondir nos connaissances sur les relations structure-fonction du récepteur LDL.

Summary

The incidence of atherosclerosis and myocardial infarction rises in proportion to the plasma cholesterol level, more specifically the plasma level of LDL-cholesterol. Goldstein and Brown's work led to the genetic basis of familial hypercholesterolemia (FH), shown to be caused by inherited defects in the gene encoding the low density lipoprotein (LDL) receptor. These defects disrupt its function which can be evaluated on fibroblasts and lymphocytes.

First we studied the LDL receptor expression on different cell types (HeLa cells, fibroblasts, lymphocytes, Epstein-Barr virus transformed lymphocytes, U937 cells and monocyte-macrophages).

Then we selected patients on the base of their plasma lipid levels, comparable to those of heterozygotes FH. We have shown that hypercholesterolemia can be due to a LDL receptor and/or an apolipoprotein B deficiency. Despite of the diagnosis of heterozygotes FH, some patients could express a normal LDL receptor activity on lymphocytes and fibroblasts. Fenofibrate and simvastatin, medications for the treatment of hypercholesterolemia, had the same effects on the lipid levels of these patients and on those of heterozygotes FH. We suggest that, for the patients with potent normal LDL receptor activity, the LDL receptor is highly inhibited *in vivo*, probably because of disruption of the regulation.

Our results demonstrate the usefulness of the cell LDL receptor assay, and the complementary nature of the cellular and genetic tests.

Abréviations

AA	acide aminé
ACAT	Acyl Coenzyme A Cholesterol acylTransferase
Ag	antigénique
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
apo	apolipoprotéine
CETP	Cholesterol Ester Transfert Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
FCR	Fractional Catabolic Rate (mesure du métabolisme <i>in vivo</i> d'une substance injectée)
FH	Hypercholestérolémie Familiale
GMP	Guanosine MonoPhosphate
HDL	High Density Lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
HMG CoA réductase	3 Hydroxy-3-MéthylGlutaryl Coenzyme A Réductase
IDL	Intermediary Density Lipoprotein (lipoprotéine de densité intermédiaire)
Kd	constante de dissociation
LCAT	Lecithin Cholesterol Acyl Transferase
LDL	Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de basse densité)
LPDS	LipoProtein Deficient Serum (sérum déficient en lipoprotéines)
mRNA	RNA messagers
PKC	Proteine Kinase C
RE	Reticulum Endoplasmique
SAB	sérumalbumine bovine
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SRE	Sterol Regulatory Element
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de très basse densité)

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
--------------	---

CHAPITRE I : L'HYPERCHOLESTEROLEMIE

I. LE CHOLESTEROL	6
I.1. Le cholestérol exogène	6
I.2. La synthèse <i>de novo</i> du cholestérol	7
I.2.1. L'HMG CoA réductase	7
I.2.2. La régulation de l'HMG CoA réductase	10
I.3. Le transport du cholestérol - Les lipoprotéines	11
I.3.1. La structure des lipoprotéines	11
I.3.2. La classification des lipoprotéines	14
I.4. Le métabolisme des lipoprotéines	16
I.4.1. Les chylomicrons	16
I.4.2. Les VLDL	18
I.4.3. Les LDL	18
I.4.4. Les HDL	19
I.5. Conclusion	21
II. LE RECEPTEUR LDL	23
II.1. La structure du récepteur LDL	23
II.1.1. Le premier domaine amino-terminal	23
II.1.2. Le second domaine	25
II.1.3. Le troisième domaine glycosylé	26
II.1.4. Le quatrième domaine membranaire	26
II.1.5. Le cinquième domaine carboxy-terminal	26

II.2. Le gène et la biosynthèse du récepteur LDL	27
II.2.1. La structure du gène	27
II.2.2. La biosynthèse du récepteur LDL	29
II.3. Le rôle et le métabolisme du récepteur LDL	31
II.4. Les ligands du récepteur LDL	32
II.5. Les mutations sur le gène du récepteur LDL	34
II.5.1. Classe I : pas de précurseur détectable	38
II.5.2. Classe II : défaut de maturation du précurseur	39
II.5.3. Classe III : précurseur mature - fixation anormale des LDL	41
II.5.4. Classe IV : précurseur mature, fixation des LDL, internalisation anormale du complexe	41
II.6. La régulation du récepteur LDL	42
II.6.1. La régulation de la transcription du gène du récepteur LDL	42
II.6.2. Les autres facteurs physiologiques régulant la transcription du gène du récepteur LDL	45
III. L'APOLIPOPROTEINE B-100	48
III.1. La structure de l'apolipoprotéine B-100	48
III.2. Le gène de l'apolipoprotéine B-100	51
III.3. Le métabolisme de l'apolipoprotéine B-100	53
III.4. Les variations génétiques de l'apolipoprotéine B-100	54
III.4.1. Les polymorphismes antigéniques	54
III.4.2. Les polymorphismes de restriction	55
III.4.3. "La mutation 3500"	56
III.4.4. Le polymorphisme de la région 3' du gène	58
III.4.5. Les autres mutations	58

IV. LES AUTRES FACTEURS D'HYPERCHOLESTEROLEMIE	60
IV.1. L'hyperlipidémie familiale combinée	60
IV.2. La dysbétalipoprotéïnémie	61
IV.3. L'hypercholestérolémie secondaire à d'autres pathologies	61
IV.4. Les hormones sexuelles	62
IV.5. L'âge	63
IV.6. L'alimentation	64
V. L'APPROCHE PHARMACOLOGIQUE	67
V.1. Les résines séquestrantes	67
V.2. Les fibrates	68
V.3. Les inhibiteurs de l'HMG CoA réductase	68
V.4. La "thérapie combinée"	70

CHAPITRE II : ETUDE DU RECEPTEUR LDL SUR DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES

I. ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS LDL SUR CELLULES HeLa	77
I.1. Matériels et méthodes	77
I.1.1. La culture des cellules	77
I.1.2. Les lipoprotéines	77
I.1.3. Technique de dosage du récepteur LDL	78
I.2. Résultats	78
I.3. Conclusion	82
II. ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS LDL SUR FIBROBLASTES	83
II.1. Matériels et méthodes	83
II.1.1. Les sujets	83
II.1.2. La culture des cellules	84
II.1.3. Les lipoprotéines	84
II.1.4. Technique de dosage du récepteur LDL	84
II.2. Résultats	85
II.3. Conclusion	89
III. ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS LDL SUR LYMPHOCYTES	93
III.1. Matériels et méthodes	93
III.1.1. Les lipoprotéines	93
III.1.2. Les immunoglobulines	94
III.1.3. Les lymphocytes	94

III.1.4. L'immunofluorescence indirecte	94
III.1.5. La fluorescence directe	95
III.2. L'immunofluorescence indirecte	96
III.2.1. Résultats	96
III.2.2. Discussion	99
III.3. La fluorescence directe	100
III.3.1. Résultats	100
III.3.2. Discussion	103
III.4. Conclusion	103
IV. ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS LDL SUR LYMPHOCYTES TRANSFORMES PAR LE VIRUS EPSTEIN-BARR	105
IV.1. Matériels et méthodes	105
IV.1.1. L'isolement des lymphocytes	105
IV.1.2. La transformation des lymphocytes par le virus Epstein-Barr	105
IV.1.3. La culture des lignées lymphocytaires transformées	106
IV.1.4. Les lipoprotéines	107
IV.1.5. Techniques de dosage du récepteur LDL	107
IV.2. Etude de la fixation à 4°C, de la fixation-internalisation et de la dégradation à 37°C des ¹²⁵ I-LDL	108
IV.2.1. Méthodes	108
IV.2.2. Résultats	110
IV.3. Etude de la fixation à 4°C des LDL par immunocyto- fluorimétrie indirecte	113
IV.3.1. Méthode	113
IV.3.2. Résultats	114

IV.4. Etude de la fixation et de l'internalisation des LDL fluorescentes par cytométrie de flux	116
IV.4.1. Méthode	116
IV.4.2. Résultats	116
IV.5. Conclusion	117
V. ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS LDL SUR CELLULES U937 ET MONOCYTES-MACROPHAGES HUMAINS	120
V.1. Matériels et méthodes	120
V.1.1. La culture des cellules	120
V.1.2. Les lipoprotéines	122
V.1.3. Technique de dosage	124
V.2. Résultats	124
V.2.1. Les cellules U937	124
V.2.2. Les monocytes-macrophages humains	128
V.3. Conclusion	128

CHAPITRE III : ETUDE DE DIFFERENTS CAS- D'HYPERCHOLESTEROLEMIE

I. INDIVIDUS SELECTIONNES CLINIQUEMENT HETEROZYGOTES POUR L'HYPERCHOLESTEROLEMIE FAMILIALE	133
I.1. Matériels et méthodes	134
I.1.1. Les sujets et le protocole d'étude	134
I.1.2. L'étude des récepteurs LDL	134
I.1.3. Les bilans lipidiques	135
I.2. Résultats	136
I.3. Discussion - Conclusion	146
II. FAMILLES SELECTIONNEES DONT UN ENFANT EST HYPERCHOLESTEROLEMIQUE	150
II.1. Matériels et méthodes	150
II.1.1. Les familles	150
II.1.2. Les bilans	151
II.1.3. Le dosage de l'activité des récepteurs LDL	151
II.1.4. La fixation des LDL des sujets sur les cellules HeLa	152
II.2. Résultats	152
II.2.1. La famille K.	152
II.2.2. La famille C.	154
II.2.3. La famille S.	158
II.2.4. La famille R.	161
II.3. Conclusion	164

III. CAS PARTICULIER DE LA FAMILLE M.	168
III.1. Matériels et méthodes	168
III.1.1. Les sujets de la famille M.	168
III.1.2. Les bilans	168
III.1.3. Le dosage de l'activité des récepteurs LDL	170
III.1.4. Etude des LDL de la famille M.	170
III.2. Résultats	174
III.2.1. Activité des récepteurs LDL cellulaires	174
III.2.2. Etude des LDL	179
III.3. Conclusion	193
IV. SUJETS SELECTIONNES POUR UN DEFICIT EN APOB	194
IV.1. Matériels et méthodes	194
IV.1.1. Les sujets	194
IV.1.2. La mutation 3500 de l'apoB	195
IV.1.3. L'activité des récepteurs LDL	195
IV.2. Résultats	195
IV.2.1. Les bilans lipidiques	195
IV.2.2. La mutation 3500	195
IV.2.3. L'activité des récepteurs LDL	197
IV.3. Discussion	197
IV.4. Conclusion	199
V. LA FAMILLE Y.	201
V.1. Matériels et méthodes	201
V.1.1. Les sujets	201
V.1.2. Les cellules	201
V.1.3. Les lipoprotéines	204

V.1.4. Les méthodes de dosage du récepteur LDL	204
V.2. Résultats	204
V.2.1. Etude de l'activité des récepteurs LDL à 4°C par radioligand	204
V.2.2. Immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C	206
V.2.3. Fluorescence directe	206
V.3. Conclusion	209
CONCLUSION	213
APPENDICE TECHNIQUE	219
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	240

INTRODUCTION

Le cholestérol est un constituant essentiel des membranes de toutes les cellules qui sont toutes capables de synthétiser cette molécule. Cependant les cellules utiliseront préférentiellement le cholestérol circulant dans le plasma et le liquide interstitiel provenant de la synthèse hépatique ou de l'absorption intestinale.

Le cholestérol, insoluble dans l'eau, est transporté dans des édifices macromoléculaires globulaires, appelés lipoprotéines, formés par l'association de lipides hydrophobes (cholestérol et triglycérides) et hydrophiles (cholestérol estérifié et phospholipides) et d'une ou plusieurs protéines, appelées apolipoprotéines. Les lipoprotéines de basse densité, les LDL (pour Low Density Lipoproteins) sont les transporteurs majeurs du cholestérol (70% environ du cholestérol plasmatique).

Le métabolisme du cholestérol est très fortement régulé. L'homéostasie cellulaire et plasmatique est assurée par la voie de récepteurs spécifiques : les récepteurs LDL. Ces récepteurs fixent spécifiquement les LDL par leur protéine, l'apolipoprotéine B. Le complexe récepteur-LDL est internalisé dans la cellule. Alors que le récepteur retourne vers la surface cellulaire, les LDL sont dégradés dans les lysosomes. Le cholestérol ainsi libéré inhibe sa propre biosynthèse, inhibe la synthèse et l'expression du récepteur LDL et active le stockage du cholestérol sous forme estérifiée, moins toxique pour la cellule.

Le métabolisme du cholestérol est cependant tellement complexe que des perturbations peuvent intervenir à de multiples niveaux. Ces perturbations peuvent conduire à de graves déséquilibres tels que l'hypercholestérolémie, premier facteur de risque de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la première étape de la captation cellulaire du cholestérol, c'est-à-dire à l'interaction des LDL avec leur récepteur spécifique.

Si les LDL ne sont pas de "bonne qualité" ou si le récepteur LDL ne fixe pas bien les LDL, les LDL s'accumulent dans le plasma, provoquant une hypercholestérolémie de phénotype IIa dans la classification de Fredrickson (Beaumont et al., 1971), ce phénotype correspondant à une élévation isolée des LDL. Les LDL sont modifiées par oxydation et alors captées par des cellules telles que les macrophages initiant la plaque athéromateuse.

Les nombreux travaux de Goldstein et Brown ont permis d'élucider les bases génétiques de l'hypercholestérolémie familiale (FH). Cette maladie se caractérise par des modifications sur le gène du récepteur LDL (mutation, délétion...) conduisant à la traduction d'une protéine dont le défaut peut être évalué par son phénotype structural et fonctionnel. Les signes cliniques de l'hypercholestérolémie familiale hétérozygote sont : l'augmentation isolée de la cholestérolémie, les xanthomes tendineux, les accidents cardiovasculaires précoces... Dans sa forme hétérozygote, la fréquence de cette maladie est de 1/500. Un individu sur un million souffre de la forme plus grave de la maladie : la forme homozygote.

Un autre défaut génétique, dont la fréquence d'apparition est à peu près identique, a été récemment décrit sur le gène de l'apolipoprotéine B.

De nombreux autres facteurs peuvent être la cause d'une hypercholestérolémie.

Une première partie de ce travail expose nos connaissances sur le cholestérol et son métabolisme, et sur les hypercholestérolémies liées au récepteur LDL et l'apolipoprotéine B des LDL. D'autres causes d'hypercholestérolémie, non liées directement au récepteur LDL ni à l'apolipoprotéine B, sont évoquées.

Le deuxième chapitre expose les techniques que nous avons utilisées pour étudier l'expression du récepteur LDL de différents types cellulaires. Ce

travail technique nous a permis de standardiser les méthodes précédemment publiées et de mettre au point de nouveaux protocoles d'étude.

Ces techniques sont ensuite appliquées à l'investigation de l'expression du récepteur LDL cellulaire dans différentes études. Ces résultats sont exposés dans le chapitre III. Les patients que nous avons sélectionnés (individus ou familles) présentent tous un bilan lipidique et des signes cliniques les classant dans l'hypercholestérolémie familiale.

Dans un premier temps, notre but était de montrer que nous pouvions, par des techniques sur cellules, diagnostiquer un déficit des fonctions du récepteur LDL qui pourrait expliquer l'hypercholestérolémie isolée observée chez certains de nos patients. Différents types cellulaires ont été utilisés et nous avons discuté les avantages et les inconvénients de chacun.

Dans un deuxième temps, nous voulions montrer que l'hypercholestérolémie d'autres patients ayant un bilan lipidique comparable n'était pas forcément liée à une déficience de l'expression *in vitro* du récepteur LDL. En effet, elle pouvait être liée à un défaut du ligand (LDL ou apolipoprotéine B), mais d'autres hypothèses peuvent aussi être envisagées.

CHAPITRE I

L'HYPERCHOLESTEROLEMIE

I. LE CHOLESTEROL

Le cholestérol, molécule de structure stéroïdienne, joue un rôle essentiel dans la modulation des caractéristiques physico-chimiques et de la fonction des membranes.

Le cholestérol est aussi le précurseur des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires et de la vitamine D.

Le cholestérol provient de l'alimentation par absorption au niveau de l'intestin. Il est également synthétisé par la plupart des cellules, bien que le foie et l'intestin soient quantitativement les seuls organes contribuant au cholestérol circulant.

Il est transporté dans le sang par les lipoprotéines.

I.1. Le cholestérol exogène

L'intestin grêle joue un rôle important dans le métabolisme du cholestérol.

Le cholestérol alimentaire, principalement sous forme d'esters de cholestérol, est hydrolysé par une cholestérol estérase pancréatique.

Les cellules épithéliales intestinales captent le cholestérol libre des aliments et des acides biliaires. L'absorption du cholestérol non estérifié par les cellules de l'intestin est un processus passif de diffusion. Cependant la capacité d'absorption est limitée, ce qui serait un facteur majeur de protection, minimisant les effets pathologiques d'un régime très riche en cholestérol (Rudney et Sexton, 1986).

Dans l'entérocyte, le cholestérol est estérifié. Les esters de cholestérol, les triglycérides, les apolipoprotéines (apo) B48 et E sont assemblés pour former les chylomicrons, qui sont sécrétés dans les canaux lymphatiques intestinaux et qui gagnent ensuite la circulation générale.

La lipoprotéine lipase fixée aux cellules endothéliales des capillaires décharge les chylomicrons de leurs triglycérides pour donner les "remnants de chylomicrons".

Ces chylomicrons résiduels sont alors captés par le foie par l'intermédiaire du récepteur E ou LRP pour LDL-Receptor-Related Protein (Beisiegel et al. 1989 ; Kowal et al., 1989 ; Scott, 1989). C'est de cette façon que le cholestérol exogène parvient jusqu'au foie.

Très récemment, Strickland et al. (1990) ont montré que le LRP et le récepteur de l'alpha 2-macroglobuline ont la même séquence protéique, suggérant qu'il n'existerait qu'un seul récepteur multifonctionnel.

Les cellules hépatiques vont excréter une partie des esters de cholestérol dans la bile sous forme d'acides biliaires et de cholestérol libre.

Une autre partie du cholestérol alimentaire, avec le cholestérol synthétisé *de novo* par les cellules hépatiques, est sécrétée dans la circulation générale comme composant des lipoprotéines de très basse densité (VLDL).

A côté de l'absorption intestinale du cholestérol, les cellules du foie et de l'intestin réalisent la synthèse *de novo* du cholestérol.

I.2. La synthèse *de novo* du cholestérol

La synthèse du cholestérol à partir d'un acétate fait intervenir au moins 30 enzymes.

La 3-Hydroxy-3-Méthylglutaryl Coenzyme A réductase (HMG CoA réductase), enzyme clef de cette synthèse, réduit l'HMG CoA en acide mévalonique (Figure 1) (Rudney et Sexton, 1986).

La synthèse du cholestérol se fait principalement dans le foie et l'intestin.

I.2.1. L'HMG CoA réductase

L'HMG CoA réductase est une glycoprotéine de masse moléculaire 97000, composée de 887 acides aminés, ancrée dans la membrane du reticulum endoplasmique (RE) des cellules animales.

Le domaine NH₂-terminal est très hydrophobe et traverse 7 fois la membrane du RE.

Le domaine COOH-terminal hydrophile est projeté dans le cytoplasme et renferme le domaine actif de l'enzyme (Figure 2) (Liscum et al., 1985).

Les travaux de Lindgren et al. (1985) ont localisé le gène de l'HMG CoA réductase humaine sur le chromosome 5.

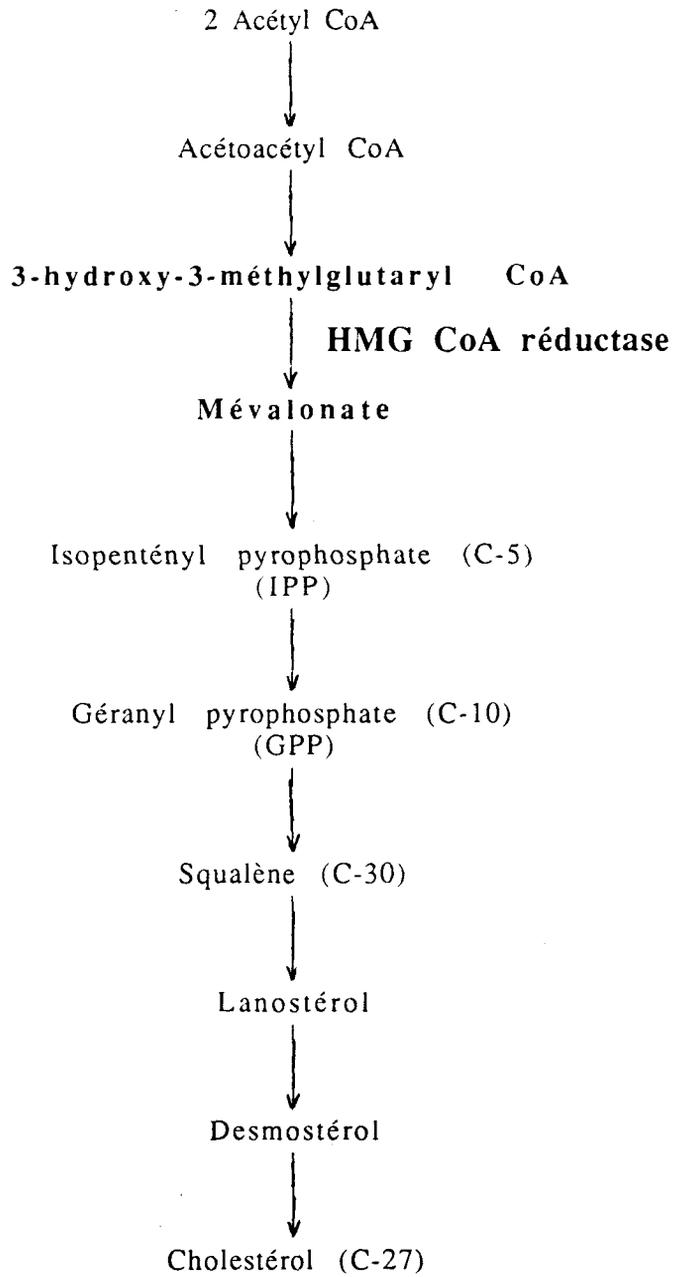


Figure 1 : Synthèse du cholestérol.

Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre d'atomes de carbone dans la molécule.

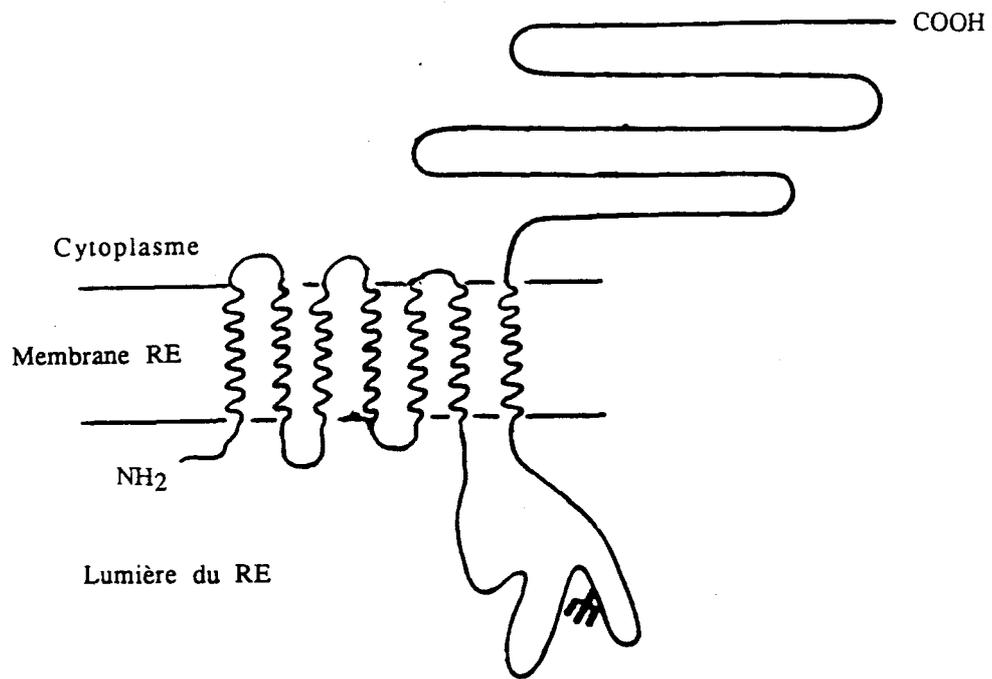


Figure 2 : Organisation membranaire de l'HMG CoA réductase.
D'après Liscum et al., 1985.

RE : Reticulum Endoplasmique.

I.2.2. La régulation de l'HMG CoA réductase

- inhibition de l'activité de l'HMG CoA réductase

L'activité de l'HMG CoA réductase répond à un rétro-contrôle négatif par les produits directs de la réaction, par le cholestérol et ses dérivés (Miao et al., 1988), par les lipoprotéines de basse densité (LDL) (Chang et Limanek, 1980 ; Brown et Goldstein, 1980).

Saucier et al. (1989) suggèrent que des oxystérols, non formés à partir de cholestérol, seraient régulateurs de l'activité HMG CoA réductase.

Des expériences de Davis et Poznansky (1987) suggèrent que la régulation de l'activité de l'enzyme par le cholestérol dépendrait partiellement de l'influence du cholestérol sur la fluidité de la membrane du RE.

L'HMG CoA réductase est aussi inactivée par phosphorylation covalente en de multiples sites. Cette modulation de l'activité par des processus de phosphorylation-déphosphorylation permet à la cellule de répondre très vite (en quelques minutes) à des effecteurs physiologiques tels que insuline, glucagon, adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et guanosine monophosphate (GMP) (Kenelly et Rodwell, 1985).

Des expériences récentes de Clarke et Hardie (1990) ont montré que, *in vitro*, l'HMG CoA réductase est inactivée par phosphorylation en un site unique par une protéine kinase activée par l'AMPC, par une protéine kinase C et par des protéines kinases calmoduline-dépendantes. Cependant, la protéine responsable de la phosphorylation de ce site *in vivo* est discutée.

- répression de la synthèse de l'HMG CoA réductase

De plus, l'activité de l'HMG CoA réductase est réprimée en présence de cholestérol par altération du taux de transcription ou de la stabilité des RNA messagers (mRNA) codant pour cette protéine (Molowa et Cimis, 1989). C'est un métabolite polaire du cholestérol, formé lors d'une réaction catalysée par le cytochrome P-450, qui serait l'effecteur réel de cette répression.

Des expérimentations d'Osborne et al. (1988) ont permis l'identification d'une séquence de 20 paires de bases, dans le promoteur de l'HMG CoA réductase, qui serait le support de la répression par les

stérols. En présence de stérols, une protéine répresseur se lierait à la région de régulation située dans le promoteur et réprimerait la transcription de l'HMG CoA réductase.

L'acide mévalonique régule lui aussi l'activité de l'HMG CoA réductase mais en contrôlant la traduction, alors que les stérols contrôleraient la transcription (Panini et al., 1989).

- dégradation de l'HMG CoA réductase

La régulation de l'activité de l'HMG CoA réductase passe aussi par la modulation de son taux de dégradation. Le 25 OH-cholestérol, dérivé du cholestérol connu pour diminuer rapidement le taux de synthèse de l'HMG CoA réductase, diminue aussi l'activité globale de cette enzyme par augmentation de sa dégradation par une voie non lysosomale, la dégradation basale de l'HMG CoA réductase, bloquée par le NH_4Cl , étant réalisée dans les lysosomes (Tanaka et al., 1986).

I.3. Le transport du cholestérol - Les lipoprotéines

I.3.1. La structure des lipoprotéines

Le cholestérol est indispensable pour la construction de toutes les membranes cellulaires mais, totalement insoluble dans l'eau, il est létal pour les cellules quand il est en excès.

Le cholestérol est donc transporté sous forme estérifiée avec des acides gras à longue chaîne. Il occupe, avec les triglycérides, le noyau hydrophobe des lipoprotéines plasmatiques. Les lipoprotéines, qui sont généralement de structure sphérique, ont une enveloppe constituée de phospholipides, de cholestérol libre, et de protéines spécifiques appelées apolipoprotéines (Figure 3).

Les apolipoprotéines participent à la structure et aux différents processus du métabolisme des lipoprotéines : biosynthèse, sécrétion, maturation et transformation plasmatique, échanges de constituants avec les cellules de l'organisme, catabolisme, activation d'enzymes plasmatiques, reconnaissance des lipoprotéines par les cellules (Tableau I).

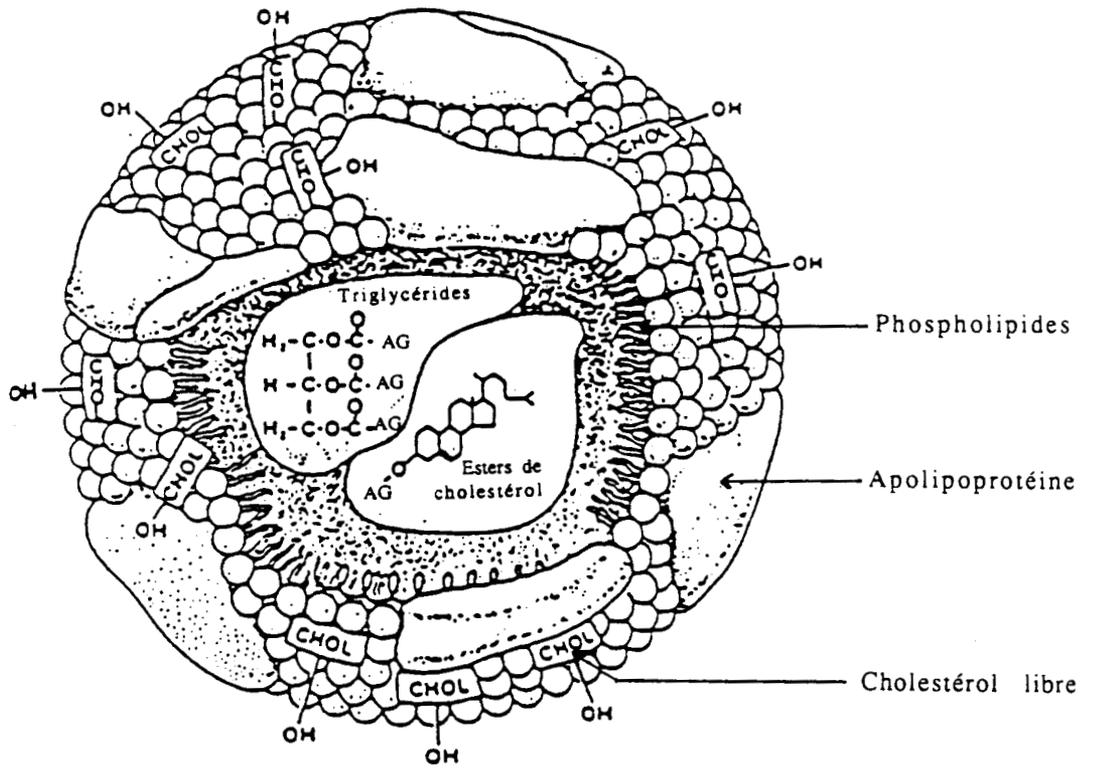


Figure 3 : Structure schématique d'une lipoprotéine.

AG : Acide Gras

Apolipoprotéine	Concentration plasmatique g/l	Lieu de synthèse	Masse moléculaire apparente	Fonction	Association aux Lipoprotéines
AI	1,0 - 1,2	Foie, Intestin	28000	Activateur LCAT Efflux de cholestérol	HDL, Chylomicrons
AII	0,3 - 0,5	Foie, Intestin	17000		HDL, Chylomicrons
AIV	0,16	Intestin	46000	Efflux de cholestérol	Chylomicrons, HDL
B100	0,7 - 1,00	Foie	550000	Sécrétion des VLDL Ligand du LDL récepteur	VLDL, IDL, LDL
B48	0,03 - 0,05	Intestin	275000	Sécrétion des chylomicrons	Chylomicrons
CI	0,04 - 0,06	Foie	7000	Activateur LCAT (in vitro)	Chylomicrons, VLDL HDL
CII	0,03 - 0,05	Foie	9000	Activateur LPL	Chylomicrons, VLDL HDL
CIII	0,12 - 0,14	Foie	9000	Inhibiteur LPL	Chylomicrons, VLDL HDL
D	0,06 - 0,07	Multiples	33000	Transport du cholestérol	Chylomicrons, HDL
E	0,03 - 0,05	Foie, Intestin, Surrénales, Macrophages	38000	Ligand du LDL récepteur et du récepteur des chylomicrons résiduels	IDL, Chylomicrons VLDL, HDL

Tableau I : Les principales apolipoprotéines.

1.3.2. La classification des lipoprotéines

L'hétérogénéité des lipoprotéines et les modifications constantes auxquelles elles sont soumises dans le plasma (échanges de lipides, d'apolipoprotéines) rendent difficile leur classification.

Les lipoprotéines peuvent être classées selon des critères physicochimiques, et en particulier en fonction de leur densité. C'est la classification la plus utilisée. En effet, selon la composition lipidique et protéique, les lipoprotéines ont une densité différente. Grâce à cela, les lipoprotéines peuvent être séparées par ultracentrifugation de flottation en cinq classes majeures (Tableau 2) (Havel et al., 1955).

- Les chylomicrons et les VLDL (lipoprotéines de très basse densité, Very Low Density Lipoproteins) sont riches en triglycérides. Les chylomicrons sont synthétisés par l'intestin et les VLDL par le foie (cf I.1 le cholestérol exogène). Les chylomicrons ne se retrouvent dans la circulation qu'après un repas riche en graisses. Les VLDL sont abondantes dans la circulation quelques heures après un repas. Les chylomicrons contiennent toutes les apolipoprotéines (l'apo B est sous forme B-48). Les apolipoprotéines des VLDL sont : l'apoB-100 indispensable à leur sécrétion ; l'apoE qui, avec l'apoB-100, permet l'interaction avec les cellules ; l'apoC-I ; les apos C-II et C-III respectivement activatrice et inhibitrice de la lipoprotéine lipase.

- Les IDL (lipoprotéines de densité intermédiaire, Intermediary Density Lipoproteins) sont en concentration très faible chez le sujet normal à jeûn. Elles correspondent à une étape métabolique des VLDL. Leur contenu protéique est composé des apos B et E.

- Les LDL (lipoprotéines de basse densité, Low Density Lipoproteins) sont des particules riches en cholestérol. Elles transportent la plus grande partie du cholestérol (65 à 70%) présent dans le plasma humain normal et leur partie protéique est essentiellement constituée de l'apolipoprotéine B-100 (apoB-100).

- Les HDL (lipoprotéines de haute densité, High Density Lipoproteins) sont les plus denses car riches en protéines (près de 50% de leur masse totale). Elles ne contiennent pas l'apoB mais des enzymes, telles que la LCAT (Lecithin Cholesterol Acyl Transferase) et des protéines de transfert. Elles sont le seul lieu d'estérification du cholestérol plasmatique. Le cholestérol estérifié est ensuite transféré

	Densité	Composition chimique - Pourcentage du poids total				
		esters de cholestérol	cholestérol libre	phospho-lipides	Trigly-cérides	protéines
Chylomicrons	< 0,960	0,5 - 1	0,5 - 1	3 - 8	86 - 94	1 - 2
VLDL	< 1,006	12 - 14	6 - 8	12 - 18	55 - 65	5 - 10
IDL	1,006 - 1,019	27 - 33	7 - 9	19 - 23	15 - 27	15 - 19
LDL	1,019 - 1,063	35 - 40	5 - 10	20 - 25	8 - 12	20 - 24
HDL	1,063 - 1,21	14 - 18	3 - 5	20 - 3	3 - 6	45 - 50

Tableau II : Lipoprotéines - Densité et composition chimique.

aux autres lipoprotéines par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP : Cholesterol Ester Transfert Protein).

Dans cette classe de densité, nous pouvons distinguer 3 sous-fractions : les HDL₁ ($1,012 < d < 1,063$), les HDL₂ ($1,063 < d < 1,125$) et les HDL₃ ($1,125 < d < 1,210$). Les HDL₃ ne contiennent pas l'apoE.

Un autre critère de classification des lipoprotéines peut être leur composition en apolipoprotéines (Figure 4).

On distinguera les particules lipoprotéiniques simples ne contenant qu'une apolipoprotéine (LpA-I, LpB...), des particules lipoprotéiniques complexes contenant deux ou plusieurs apolipoprotéines (LpB:E, LpB:C-III, LpA-I:A-II, LpB:C-III:E...) (Alaupovic, 1972).

I.4. Le métabolisme des lipoprotéines

I.4.1. Les chylomicrons

Le cholestérol alimentaire, absorbé par les cellules intestinales, va être sécrété dans la circulation générale comme composant des chylomicrons. Il est principalement sous forme estérifié, associé à des triglycérides et des apolipoprotéines (dont l'apoB-48 qui est indispensable à la structure des chylomicrons).

Dans la circulation, des apolipoprotéines sont échangées entre les HDL et les chylomicrons, qui reçoivent en particulier l'apoC-II activatrice de la lipoprotéine lipase.

Rapidement la lipoprotéine lipase, enzyme fixée par des chaînes glycaniques à la membrane externe des cellules endothéliales des vaisseaux capillaires et activée par l'apoC-II des chylomicrons, hydrolyse les triglycérides. Les acides gras ainsi libérés sont captés par les tissus et utilisés ou stockés dans le tissu adipeux.

Les édifices résiduels appelés "remnants" sont captés par les hépatocytes, puis dégradés. Ainsi est apportée au foie une partie des lipides alimentaires.

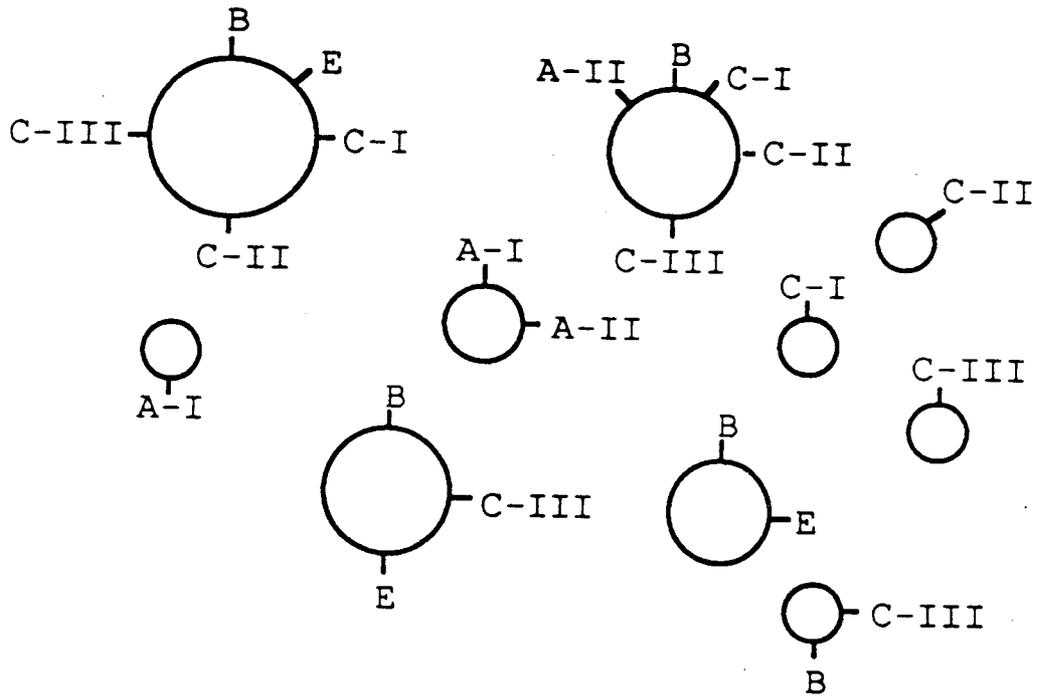


Figure 4 : Exemple de composition en apolipoprotéines de particules lipoprotéiniques.

1.4.2. Les VLDL

Les VLDL sont synthétisées par l'hépatocyte. L'apoB-100 est essentielle à leur sécrétion. Les apolipoprotéines sont synthétisées dans le reticulum endoplasmique rugueux. Les lipides (triacylglycérols, phospholipides) sont synthétisés par des enzymes situées sur la face cytoplasmique du reticulum endoplasmique. Des études très récentes s'intéressent au transport des lipides à travers la membrane du reticulum endoplasmique et à l'assemblage des composants des VLDL. Il semblerait que l'assemblage ne se fasse pas dans le reticulum endoplasmique mais plutôt dans l'appareil de Golgi (Bamberger et Lane, 1990 ; Boren et al., 1990 ; Gibbons 1990).

Elles contiennent relativement peu d'esters de cholestérol. Elles permettent plutôt la sécrétion des triglycérides endogènes.

Dans la circulation, les apolipoprotéines C et E sont principalement transférées aux VLDL par les HDL.

La lipoprotéine lipase hydrolyse les triglycérides, puis les apos C et les phospholipides sont retransférées aux HDL.

Les lipoprotéines résiduelles ou IDL sont riches en apolipoprotéines E. Elles auront une très forte affinité pour les récepteurs B, E des cellules hépatiques et elles seront captées et dégradées.

La Triglycéride Lipase Hépatique (TGLH) transforme une partie des IDL en LDL en hydrolysant les triglycérides.

1.4.3. Les LDL

L'apolipoprotéine B-100 reste liée à la particule lipidique, de sa sécrétion hépatique sous forme de VLDL à sa dégradation finale. L'apolipoprotéine B-100 est reconnue par les récepteurs B, E de tous les types cellulaires.

Compte tenu de leur faible composition en apoE et de la moindre affinité des récepteurs B, E pour l'apoB que pour l'apoE, la durée de vie des LDL (plusieurs jours) est plus longue que celle des VLDL (4 heures).

Les LDL, lipoprotéines transportant la plus grande partie du cholestérol plasmatique, assure son catabolisme principalement par une

voie spécifique hautement contrôlée : le récepteur B, E, auquel nous consacrerons la deuxième partie de ce chapitre.

Les LDL, reconnues par les récepteurs B, E regroupés dans des puits recouverts de clathrine, sont internalisées et dégradées, alors que le récepteur retourne à la surface cellulaire pour un nouveau cycle.

Le cholestérol libéré dans la cellule régule trois processus intracellulaires en une action coordonnée qui stabilise le contenu cellulaire en cholestérol (Figure 5).

- Il inhibe l'activité et la transcription du gène de l'HMG CoA réductase et accélère sa dégradation (cf chapitre I 1.2.2.).

- Le cholestérol active l'enzyme d'estérification du cholestérol, l'Acyl Coenzyme A Cholesterol Acyltransferase (ACAT), permettant le stockage, dans le cytoplasme, du cholestérol en excès sous forme de gouttelettes d'esters de cholestérol moins toxiques pour la cellule que le cholestérol libre.

- Enfin, le cholestérol réprime la synthèse des récepteurs aux LDL.

Ainsi, grâce à ces mécanismes de régulation, la cellule garde constante sa concentration en cholestérol non estérifié.

Lors d'une lésion de la paroi artérielle, d'autres types de récepteurs présents sur les macrophages ou les cellules musculaires lisses peuvent capter les LDL modifiées par oxydation (lors d'un long séjour plasmatique). Ces récepteurs non régulés contribuent à l'accumulation de cholestérol dans les macrophages de la plaque d'athérome.

I.4.4. Les HDL

Les HDL sont très hétérogènes.

Elles peuvent être considérées comme la plaque tournante des échanges de lipides entre les lipoprotéines, et entre les lipoprotéines et les cellules.

Les HDL sont essentiellement synthétisées par le foie. Elles peuvent aussi être formées à partir des constituants lipidiques et

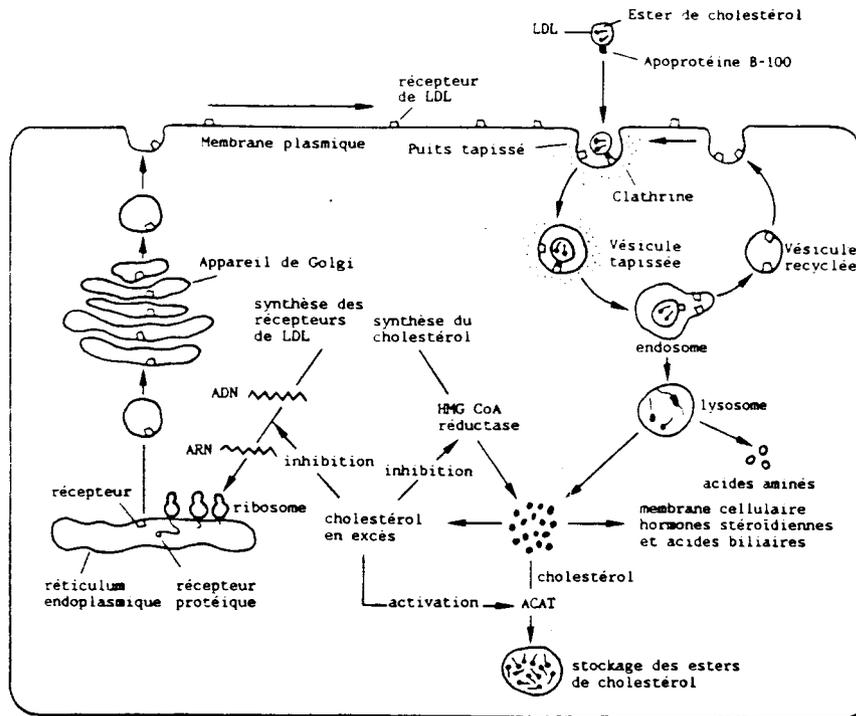


Figure 5 : Catabolisme des LDL par la voie des récepteurs LDL.
D'après Brown et Goldstein, 1986.

apolipoprotéiniques de surface relargués lors de la lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides.

Les HDL₃ globulaires sont de bons accepteurs de cholestérol cellulaire. Des signaux cellulaires, produits lors de l'interaction entre les HDL riches en apoA-I ou apoA-IV et un récepteur membranaire spécifique, permettent de mobiliser le cholestérol intracellulaire et de le faire migrer vers la membrane plasmique (Oram et al., 1981 ; Aviram et al., 1989 ; Steinmetz et al., 1990).

Le retour du cholestérol vers le foie, seul lieu de son métabolisme, peut se faire de deux façons :

- soit par le catabolisme direct des HDL au niveau hépatique, mais cette voie semble mineure,
- soit par l'intermédiaire des lipoprotéines de basse densité auxquelles le cholestérol estérifié est transféré.

I.5. Conclusion

Le métabolisme complexe du cholestérol peut, à de multiples niveaux, être régulé. Il est dépendant de l'apport alimentaire, de la synthèse hépatique, et de l'utilisation par les cellules.

L'apolipoprotéine B est la protéine majeure transporteur du cholestérol plasmatique. Elle est indispensable à l'assemblage des VLDL et à leur sécrétion dans le plasma.

Les lipases hydrolysent les triglycérides transportés vers les tissus par les VLDL. Les particules en résultant, les LDL, sont enrichies en esters de cholestérol.

Les LDL vont délivrer le cholestérol aux tissus et au foie par la voie de récepteurs, les récepteurs LDL, reconnaissant spécifiquement l'apoB des LDL et l'apoE des VLDL, des IDL et des HDL.

La concentration plasmatique du cholestérol est principalement corrélée avec la concentration plasmatique en lipoprotéines contenant l'apoB.

La concentration plasmatique des LDL, et donc du cholestérol, est déterminée par un équilibre entre la production des LDL à partir des VLDL, et leur clairance hépatique par l'intermédiaire du récepteur LDL.

Il peut donc y avoir hypercholestérolémie par hyperproduction mais aussi par défauts du catabolisme des LDL.

Ces défauts de catabolisme peuvent être dus, soit au ligand, soit au récepteur LDL.

Dans les chapitres suivants, nous verrons les différentes pathologies conduisant à des hypercholestérolémies, et en particulier celles que l'on a pu attribuer au récepteur LDL ou à l'apolipoprotéine B.

II. LE RECEPTEUR LDL

Dès 1973, Brown et Goldstein utilisaient les fibroblastes de peau en culture comme modèle d'étude des défauts génétiques du métabolisme des lipoprotéines. Ils montraient que les cellules d'un patient souffrant de la forme homozygote de l'hypercholestérolémie familiale (FH) étaient incapables d'utiliser le cholestérol des LDL. En cherchant la cause de ce défaut, ils montraient alors que les cellules normales possédaient à leur surface un récepteur fixant spécifiquement les LDL : le récepteur LDL. Ces travaux initièrent une longue série d'études pour définir les propriétés du récepteur LDL. Ils conduisirent à sa purification et au clonage de son gène.

Le récepteur LDL a été purifié pour la première fois à partir du cortex adrénalien bovin par Schneider et al. (1982).

Dans un premier temps, la séquence d'acides aminés de la partie carboxy-terminale du récepteur LDL a été déterminée par Russel et al. à partir du cDNA (Russel et al., 1983 ; 1984).

Puis Yamamoto rapporte le clonage, la séquence nucléotidique et l'expression dans les cellules COS du cDNA complet de 5,3 kilobases du récepteur LDL. De la séquence nucléotidique, il en déduit la séquence des acides aminés (Yamamoto et al., 1984).

II.1. La structure du récepteur LDL

Le récepteur LDL humain est composé de 839 acides aminés et peut être divisé en cinq domaines (Figure 6) (Yamamoto et al., 1984).

II.1.1. Le premier domaine amino-terminal

Le premier domaine est situé à l'extrémité NH₂-terminale. Composé de 292 acides aminés, il est très riche en cystéines (42 résidus). Ce domaine est situé du côté externe de la membrane plasmique. Chacun de ces résidus cystéine apparaît être impliqué dans un pont disulfure. Le récepteur LDL, grâce à ses ponts disulfures, est extrêmement stable et garde ses propriétés de fixation des LDL, même après avoir été porté à ébullition en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ou de guanidine, tant qu'il n'est pas mis en présence d'agents réducteurs (Daniel et al., 1983). Cette stabilité pourrait protéger la molécule des variations de pH

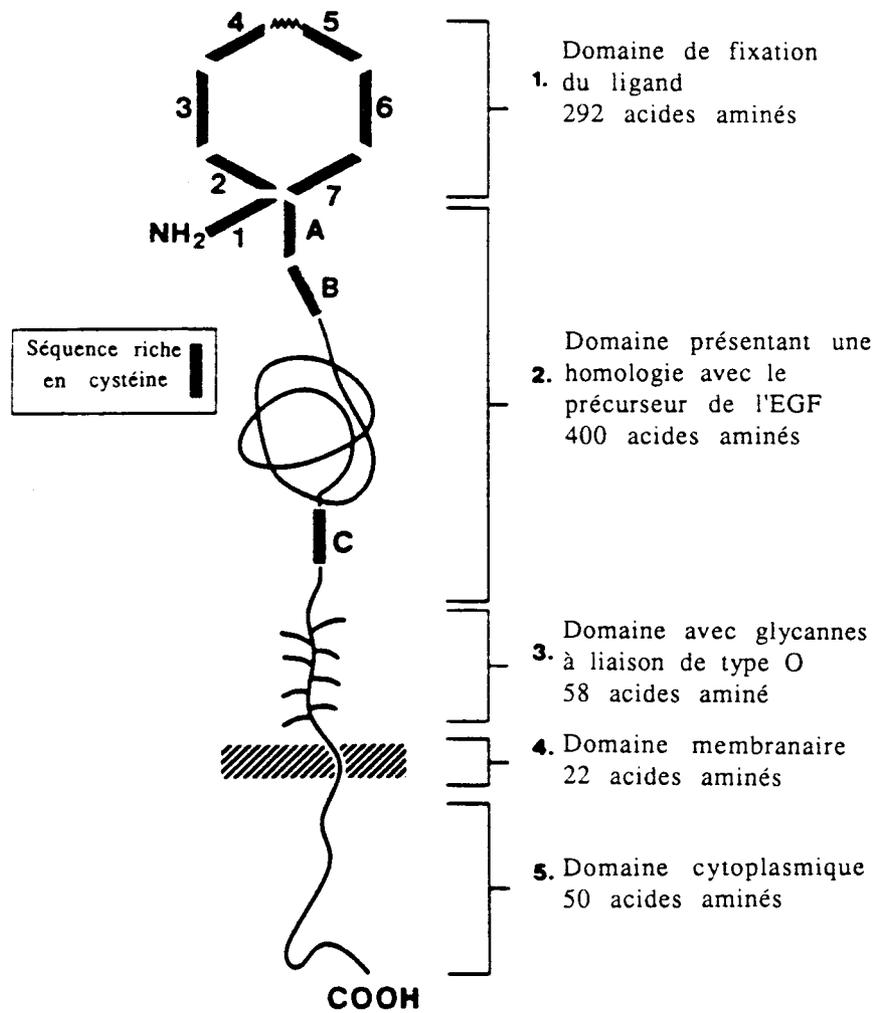


Figure 6 : Le récepteur LDL : une chaîne glycoprotéinique composée de cinq domaines.

D'après Esser et al., 1988.

quand elle est recyclée plusieurs fois entre les puits recouverts de la surface cellulaire et les endosomes intracellulaires à pH acide (Brown et al., 1983).

Ce domaine NH₂-terminal est composé de sept séquences répétées de 40 acides aminés. L'extrémité COOH de chacune de ces sept séquences est fortement chargée négativement. Ces séquences sont complémentaires de séquences chargées positivement des ligands du récepteur LDL : l'apoE et l'apoB (Innerarity et al., 1984).

La construction de mutations par mutagénèse a permis à Esser et al. (1988) de montrer que les sept séquences ne sont pas équivalentes du point de vue de la fonction :

- la première séquence ne joue pas de rôle dans la fixation des LDL ni des VLDL,
- les séquences 2 et 3, puis 6 et 7 sont nécessaires pour la fixation maximale des LDL, mais non des VLDL,
- la séquence 5 apparaît indispensable pour la fixation des deux ligands.

Le domaine de fixation se réduit donc à six séquences répétées et il présente une symétrie avec huit acides aminés de liaison entre les séquences 4 et 5.

La première séquence contient un site de fixation du calcium et est très immunogène. Cependant, la fonction de cette séquence du récepteur LDL des fibroblastes n'est pas élucidée (Van Driel et al., 1987).

II.1.2. Le second domaine

Le second domaine du récepteur LDL, constitué d'environ 400 acides aminés, présente une homologie de structure (33% d'acides aminés identiques) avec le domaine extracellulaire du précurseur du facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) de souris. Ce second domaine est aussi formé de courtes séquences répétitives d'environ 40 acides aminés, désignées par les lettres A, B et C.

Davis et al. (1987a) ont réalisé des analyses de délétion pour élucider le rôle de ce deuxième domaine. Cette région est nécessaire pour la fixation des LDL, et non des VLDL, sur des cellules intactes. En effet, elle permet de placer le domaine de fixation du récepteur dans une conformation qui le rend accessible aux LDL à la surface cellulaire.

L'apoB-100 est une protéine de masse moléculaire importante (550000) dont les sites de fixation au récepteur LDL doivent avoir une configuration relativement fixe, alors que les VLDL contiennent de multiples copies de l'apoE (38000) et n'ont pas besoin de conformation particulière du récepteur LDL.

Ce second domaine est nécessaire pour la dissociation acido-dépendante des VLDL, ainsi que pour le recyclage du récepteur sans dégradation.

Il semblerait que l'altération de la structure de la séquence A de ce domaine conduise à une réduction de moitié de la fixation des LDL (Esser et al., 1988).

I.1.3. Le troisième domaine glycosylé

Le troisième domaine est une séquence de 58 acides aminés dont 18 résidus sérine ou thréonine. Des chaînes glycosylées sont liées à cette séquence par des liaisons de type O.

I.1.4. Le quatrième domaine membranaire

Des expériences de protéolyse (Russel et al., 1984) ont montré que le quatrième domaine de 22 acides aminés hydrophobes traverse la membrane cytoplasmique.

I.1.5. Le cinquième domaine carboxy-terminal

Le cinquième domaine du récepteur LDL humain est une séquence de 50 acides aminés qui correspond à la partie COOH-terminale localisée du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire. Cette séquence présente une très forte homologie avec celle du récepteur LDL bovin où seulement 4 résidus d'acides aminés diffèrent.

Ce domaine cytoplasmique contient plusieurs résidus sérine et thréonine, et trois résidus tyrosine, sites potentiels de phosphorylation.

Ce domaine joue un très grand rôle dans la compartimentation des récepteurs dans les puits recouverts, grâce à des interactions avec la clathrine elle-même, ou avec des protéines associées à la clathrine.

Davis et al. (1987b) ont montré, par des expériences de mutagénèse, qu'un résidu aromatique en position 807 est nécessaire pour une internalisation correcte du récepteur LDL. Seuls les 22 premiers acides aminés du domaine cytoplasmique sont indispensables à l'internalisation rapide du récepteur LDL.

Chen et al. (1990) ont confirmé les travaux de l'équipe de Davis. Une séquence de type Asparagine-Proline-X-Tyrosine est indispensable pour l'internalisation du récepteur LDL, avec la tyrosine en position 807.

II.2. Le gène et la biosynthèse du récepteur LDL

II.2.1. La structure du gène

Par des expérimentations d'hybridation *in situ*, le locus du récepteur LDL humain, d'environ 45 kilobases, a été localisé sur le bras court distal du chromosome 19 (Lindgren et al., 1985).

Le gène est divisé en 18 exons et 17 introns (Figure 7). 13 des 18 exons codant pour le récepteur LDL présentent des homologies de séquences avec des gènes d'autres protéines (protéine C9 du complément, précurseur de l'EGF, facteurs de coagulation IX et X). Le récepteur LDL apparaît donc comme une protéine mosaïque construite par des exons homologues à ceux d'autres protéines (Südhof et al., 1985).

Il existe une très forte corrélation entre les domaines structuraux de la protéine et les séquences d'exons du gène du récepteur LDL.

Le premier exon code pour une séquence signal de 21 acides aminés, pour la plupart hydrophobes, qui est clivée après la traduction.

Le premier domaine est codé par les exons 2 à 6.

Le domaine suivant, présentant de fortes homologies avec le précurseur de l'EGF, est codé par 8 exons successifs. Chacune des séquences répétées A, B et C (cf. II.1.2.) est codée par un exon.

La partie comportant des O-glycannes est codée par un seul exon, alors que la région transmembranaire est interrompue par un intron.

Un autre intron interrompt la séquence codant pour la queue cytoplasmique de la partie COOH-terminale du récepteur LDL.

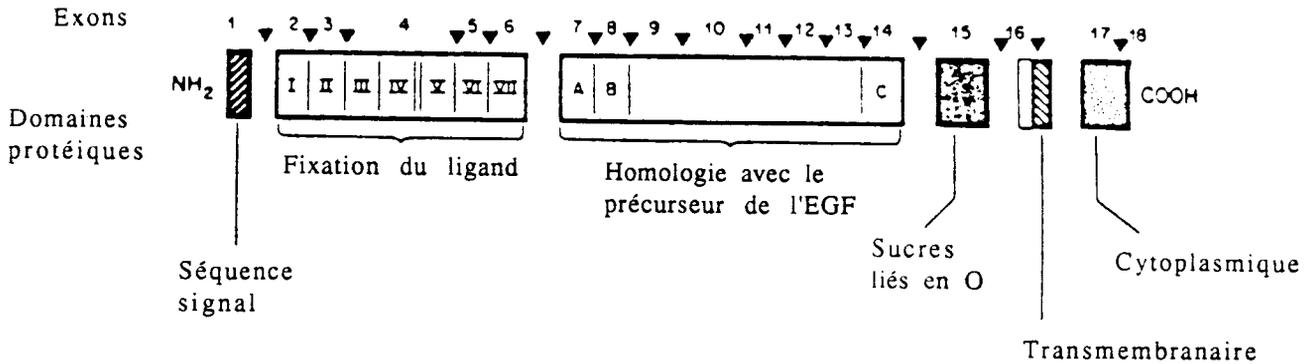


Figure 7 : Organisation des exons et des domaines protéiques du récepteur LDL humain.

D'après Südhof et al., 1985.

Les séquences riches en résidus cystéine du domaine de fixation du ligand sont désignées par les chiffres I à VII. Les séquences IV et V sont séparées par 8 acides aminés.

Les trois séquences riches en résidus cystéine du domaine homologue au précurseur de l'EGF sont désignées par les lettres A, B et C.

La position des introns interrompant la région codante est indiquée par les flèches.

Le dernier exon code pour les 12 derniers acides aminés de la protéine dans sa partie COOH-terminale ainsi que pour une longue région (2,5 kilobases) qui ne sera pas traduite et qui présente de nombreux éléments de répétition Alu (Yamamoto et al., 1984). Les séquences Alu représentent 3 à 6% de la masse totale du DNA. Elles ont environ 300 paires de base, et sont constituées en général de 2 séquences répétées "tête-bèche" et d'une séquence riche en adénine à leur extrémité 3' (Figure 8). Ces séquences Alu sont éliminées lors de l'épissage des RNA. La région 5' du gène du récepteur LDL n'a pas plus de 100 paires de bases. Cette région n'est pas traduite. L'analyse de cette région sera reportée dans une partie ultérieure traitant de la régulation du récepteur LDL (cf. II.4.).

II.2.2. La biosynthèse du récepteur LDL

La présence d'une séquence signal NH₂-terminale hydrophobe suggère que le récepteur LDL est synthétisé dans le reticulum endoplasmique rugueux.

Le récepteur LDL est d'abord synthétisé sous forme d'un précurseur de masse moléculaire apparente de 120 000 (gel de polyacrylamide en SDS). Ce précurseur est glycosylé (2 chaînes N-glycosylées et de multiples résidus GalNAc liés par des liaisons de type O) (Cummings et al., 1983).

30 à 40 minutes après sa synthèse, le récepteur LDL a une masse moléculaire apparente de 160 000 (Tolleshaug et al., 1982). Cette augmentation de masse moléculaire apparente est attribuable à l'élongation des chaînes liées en O (et non à l'addition de sucres liés par des liaisons de type N) dans l'appareil de Golgi, ainsi qu'à un changement conformationnel.

Le récepteur LDL migre ensuite vers la surface cellulaire où il se concentre dans des régions particulières : les puits recouverts de clathrine.

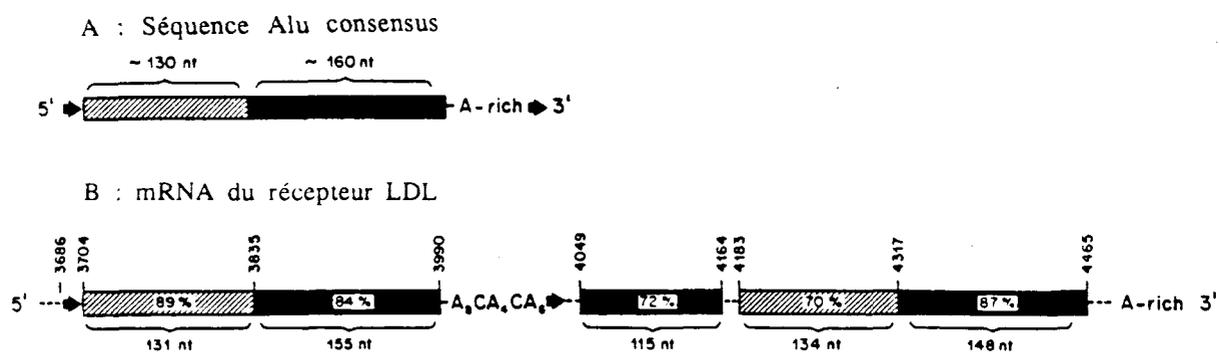


Figure 8 : Organisation des séquences Alu de la région 3' non traduite du mRNA du récepteur LDL.

D'après Yamamoto et al., 1984.

A : Schéma d'une séquence Alu humaine.

B : Schéma des séquences Alu du mRNA du LDL récepteur.

nt : nucléotide.

Séquence hachurée : séquence répétée gauche.

Séquence noire : séquence répétée droite.

Les pourcentages correspondent au degré d'homologie entre les séquences répétées gauche et droite.

II.3. Le rôle et le métabolisme du récepteur LDL

Le concept d'"endocytose par récepteur" fut formulé par Goldstein et Brown en 1974 pour expliquer que la régulation du métabolisme cellulaire du cholestérol dépendait d'une séquence précise d'événements : fixation sur la surface cellulaire, internalisation puis dégradation intracellulaire des LDL plasmatiques.

Le récepteur LDL fait partie de la classe de récepteurs qui migrent spontanément vers les puits recouverts, qui entrent dans la cellule et sont recyclés de façon continue, même en l'absence de ligands (Basu et al., 1981).

Les puits recouverts s'invaginent pour former des vésicules d'endocytose recouvertes. Très rapidement, le manteau de clathrine se dissocie. De multiples vésicules d'endocytose fusionnent pour donner naissance aux endosomes, dont le pH est maintenu à 6,5 grâce à une pompe à protons. A ce pH acide, les LDL se dissocient de leur récepteur.

Ce dernier retourne à la surface cellulaire où il peut immédiatement fixer une nouvelle LDL. Le récepteur LDL est recyclé toutes les 10 à 20 minutes, qu'il soit ou non occupé par une LDL. Grâce à sa très grande stabilité de structure, il peut supporter 150 passages dans les endosomes acides sans perdre ses fonctions.

Des travaux récents de Casciola et al. (1989) ont montré que le récepteur LDL n'était pas dégradé dans les lysosomes et que sa dégradation n'était pas associée à l'endocytose des puits recouverts ni au recyclage du récepteur.

L'endosome fusionne avec un lysosome primaire. Les composants protéiques des LDL sont hydrolysés en acides aminés, et sous l'action de lipases acides, les esters de cholestérol sont hydrolysés libérant le cholestérol (Brown et Goldstein, 1986).

Le cholestérol ainsi libéré est utilisé par les cellules pour la synthèse des membranes et, comme nous l'avons déjà indiqué (Figure 5), il exerce 3 actions de régulation au niveau de :

- la captation des LDL,
- la synthèse du cholestérol
- et de son stockage.

Des expériences de Aulinkas et al. (1985) ont montré qu'une partie des LDL pouvait subir une rapide rétro-endocytose (c'est-à-dire, retour vers la surface cellulaire), température-dépendante, intervenant après la fixation et

l'internalisation des LDL par la voie des récepteurs spécifiques (Figure 9). Ces LDL rétro-endocytées ne subissent pas d'altérations de leur structure. Cette voie pourrait donc être une alternative quand la concentration cellulaire en LDL non dégradées atteint un taux anormal, par exemple lors de déficiences lysosomales, ou quand les compartiments cellulaires normalement acides ne peuvent maintenir un pH bas.

II.4. Les ligands du récepteur LDL

Le récepteur LDL fixe les lipoprotéines contenant non seulement l'apoB mais aussi l'apoE, et indépendamment de la classe de densité des lipoprotéines.

Ainsi, le récepteur LDL reconnaît :

- les LDL,
- les IDL,
- les HDL enrichies ou non en cholestérol,
- les VLDL de sujets normaux ou hypertriglycémiques.

L'apoB sera étudiée précisément dans la partie suivante.

L'apoE est constituée de 299 acides aminés dont 10 à 20% de résidus arginine. Sa masse moléculaire est de 34145. La modification des résidus basiques de l'apoE retarde le catabolisme *in vivo* des lipoprotéines contenant l'apoE (Mahley et al., 1980).

Il existe une homologie de structure entre le domaine de fixation au récepteur de l'apoE et une région de l'apoB (Figure 10) (Knott et al., 1985). Les résidus chargés positivement sont complémentaires d'une séquence du récepteur LDL riche en résidus acides.

L'apoE possède plusieurs allèles structuraux. Les trois allèles courants, E₂, E₃, E₄ ont des fréquences respectives de 0.07, 0.78, et 0.15 (Havekes et al., 1987).

Les résultats de Pitas et al. (1979) *in vitro* révèlent que l'affinité des HDL enrichies en cholestérol pour les récepteurs est 25 fois supérieure à celle des LDL. De plus, la concentration saturante de ces HDL est 4 fois plus faible que les LDL.

Figure 9

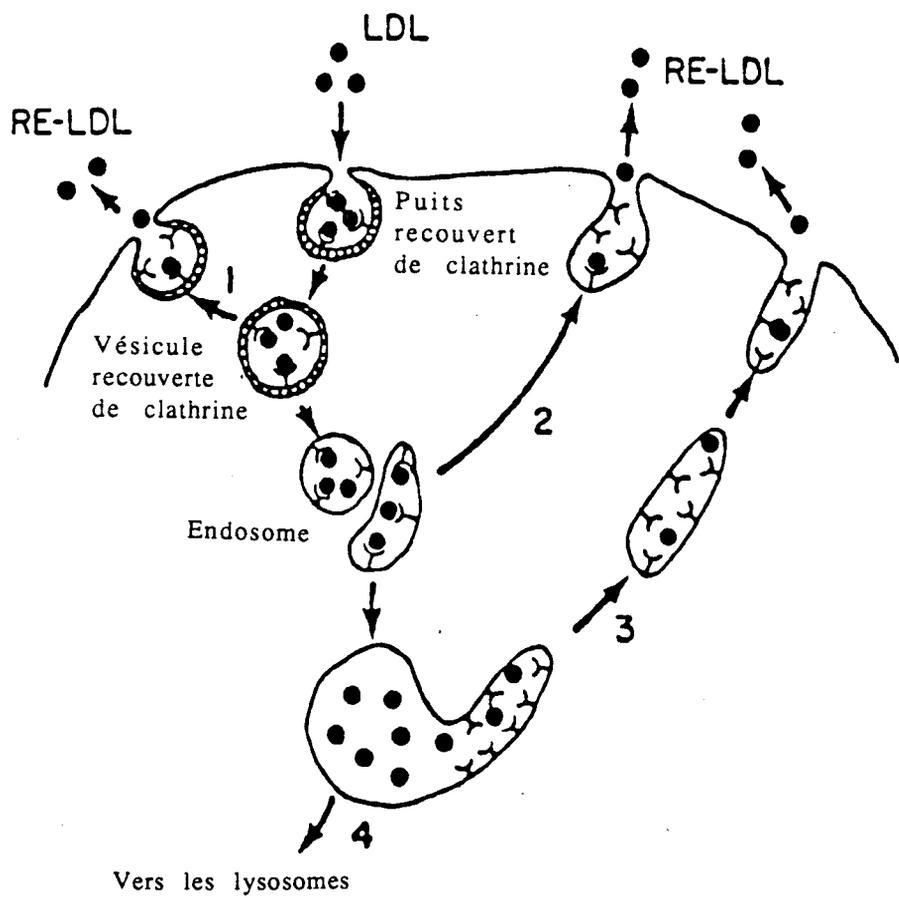


Figure 9 : Modèle de retro-endocytose des LDL par les fibroblastes humains.
D'après Aulinskas et al., 1985.

RE-LDL : LDL Retro-Endocytées.

ApoE (Résidus 140 - 150)	-His-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-
ApoB-100 (Résidus 276 - 286)	-Thr-Thr-Arg-Leu-Thr-Arg-Lys-Arg-Gly-Leu-Lys-
LDL récepteur Séquence consensus	-Cys- <u>Asp</u> -X-X-X- <u>Asp</u> -Cys-X- <u>Asp</u> -Gly-Ser- <u>Asp</u> - <u>Glu</u> -

Figure 10 : Complémentarité entre le site de liaison du récepteur LDL et de ses ligands (apoE et apoB).

En caractères gras sont indiqués les acides aminés basiques des apolipoprotéines.

Les acides aminés acides du récepteur LDL sont en gras soulignés.

D'après Knott et al., 1985.

Le récepteur aurait des sites multiples de fixation :

- sites tous accessibles à l'apoE des HDL enrichies en cholestérol.
- fixation équimolaire entre l'apoB des LDL et les sites du récepteur.

In vitro, les VLDL de sujets hypertriglycéridémiques ont plus d'affinité pour les récepteurs LDL que les LDL et les VLDL de sujets normaux (Gianturco et Bradley, 1986 ; Agnani, 1989). Ces VLDL se fixeraient par l'apoE ayant plus d'affinité pour le récepteur LDL. L'apoB ne serait pas accessible au récepteur à cause de l'importance du noyau de triglycérides.

La présence de l'apoE serait le déterminant majeur du destin métabolique du cholestérol (Yamada et al., 1989). L'endocytose contrôlée des VLDL par le récepteur LDL limite leur conversion en IDL et en LDL (Yamamoto et al., 1989).

Plus il y a d'apoE dans la particule, plus l'affinité de celle-ci pour le récepteur est élevée.

Inversement l'apoC-III gêne l'accessibilité de l'apoB d'une lipoprotéine et inhibe sa fixation sur le récepteur (Agnani et al., soumis pour publication à *Arteriosclerosis* 1990). L'apoC-III a peu d'effet sur l'interaction d'une lipoprotéine présentant une concentration élevée en apoE.

Les ligands apoE du récepteur LDL sont surtout augmentés dans les lipoprotéines isolées de sujets hypertriglycéridémiques, pathologie que nous n'aborderons pas. Cependant leur augmentation n'est pas négligeable dans les hypercholestérolémies essentielles.

II.5. Les mutations sur le gène du récepteur LDL

Des mutations sur le gène du récepteur LDL sont la cause d'une maladie à transmission autosomale dominante : l'hypercholestérolémie familiale ou hypercholestérolémie essentielle.

Ces mutations perturbent la structure et la fonction du récepteur LDL ce qui provoque une déficience familiale et héréditaire du métabolisme du cholestérol, par un mauvais catabolisme des LDL par la voie spécifique des récepteurs. Les LDL stagnent dans le sang, elles sont modifiées et vont déposer leur cholestérol au niveau des artères et des tendons.

Cette maladie se caractérise par des signes cliniques dont des infarctus précoces, des xanthomes tendineux et une concentration élevée de cholestérol dans le sang. Cette hypercholestérolémie ne s'accompagne pas d'une hypertriglycéridémie.

Il existe cliniquement deux formes de la maladie :

- une forme hétérozygote dont la fréquence est de 1 pour 500. Les individus n'héritent de leurs parents qu'un gène mutant. Leur cholestérolémie est environ deux fois supérieure à celle des sujets sains (cholestérolémie d'un sujet sain : 1,5 à 2 g/l).
- une forme homozygote dont la fréquence est de 1 pour 1 million. Les individus atteints ont les deux gènes du récepteur LDL mutants. Incapables de synthétiser des récepteurs LDL fonctionnels, ils ont dans le sang six fois plus de LDL que les individus normaux et souffrent d'infarctus du myocarde dès l'enfance. Comme il existe de multiples allèles mutants sur le locus du récepteur LDL, beaucoup d'individus désignés comme homozygotes héritent en fait de deux allèles présentant deux mutations différentes.

Les travaux de Goldstein et Brown et de leurs collaborateurs ont permis d'étudier la génétique de l'hypercholestérolémie familiale. Dès 1975, il était devenu évident que différentes mutations pouvaient affecter le récepteur LDL (Goldstein et al., 1975).

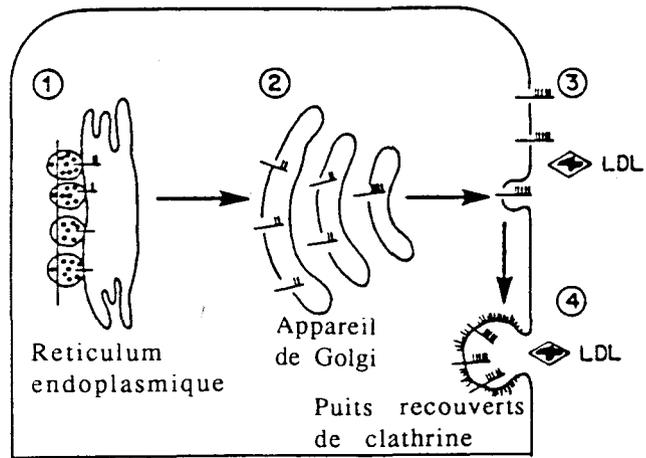
Sur des fibroblastes prélevés par biopsie de peau chez les patients homozygotes pour l'hypercholestérolémie familiale (diagnostic clinique), cette équipe a étudié :

- la fixation des LDL,
- la fixation d'anticorps monoclonaux tels que l'Ig-C7 (Beisiegel et al., 1981),
- la protéine synthétisée (Tolleshaug et al., 1983).

Ces travaux ont abouti à la description de quatre classes de mutations affectant :

- la synthèse du récepteur LDL,
- son transport,
- la fixation du ligand,
- son internalisation (Figure 11).

Plus récemment, l'analyse de la séquence des gènes mutés et l'utilisation de mutations artificielles créées par mutagénèse *in vitro* ont



Classe de mutation	Synthèse	Transport du RE vers le Golgi	Fixation des LDL	Fixation au niveau des puits recouverts de clathrine
1	→ X			
2		→ X		
3			→ X	
4				→ X

Figure 11 : Les mutations du gène du récepteur LDL.
D'après Goldstein et Brown, 1986.

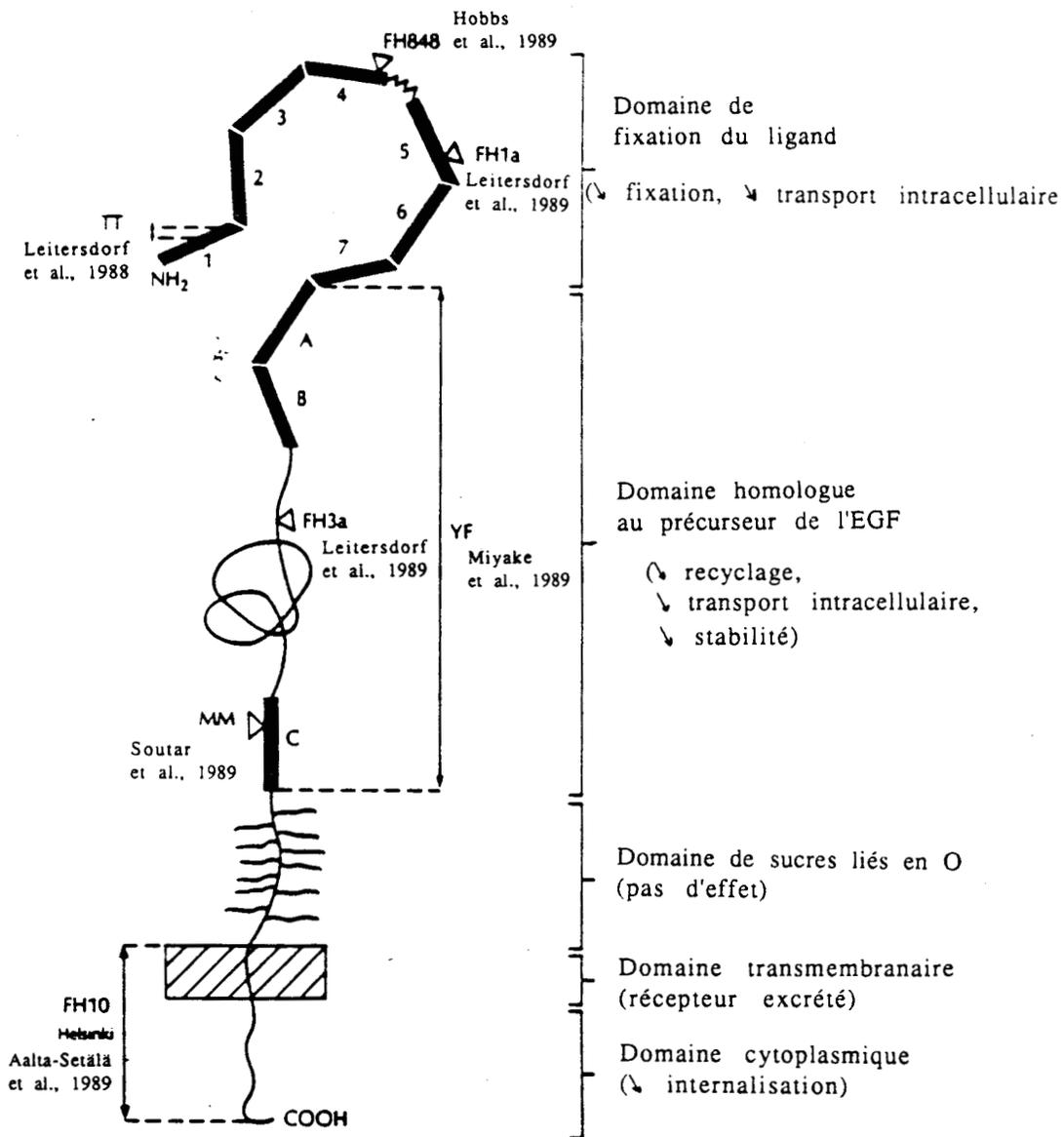


Figure 12 : Mutations naturelles du récepteur LDL récemment caractérisées. D'après Van der Westhuyzen et al., 1990.

‡ : Délétion.

∇ : Substitution.

■ : Séquence riche en résidus cystéine.

L'effet des mutations sur chaque domaine est indiqué entre parenthèses.

permis d'accumuler de nombreuses informations sur les relations structure-fonction du récepteur LDL (Figure 12).

II.5.1. Classe I : pas de précurseur détectable

Ces allèles mutants sont les plus fréquents. La protéine récepteur n'est pas du tout exprimée.

Cette classe comprend :

- les mutations non-sens qui introduisent un codon de terminaison dans la région codante,
- les mutations ponctuelles dans la région promotrice qui bloquent la transcription du mRNA,
- les mutations ponctuelles au niveau des jonctions intron-exon qui altèrent l'épissage des mRNA,
- de larges délétions.

Une mutation de classe I est le cas le plus fréquent affectant les canadiens français. Une large délétion de 10 000 bases à partir de l'extrémité 5' du gène du récepteur LDL (promoteur et exon 1) empêche la production des mRNA du récepteur LDL et donc de toute protéine (Hobbs et al., 1987).

Des travaux plus récents de Hobbs et al. (1989) suggèrent qu'il existe 13 mutations différentes dans cette classe ne conduisant à aucune synthèse de la protéine.

Le lapin Watanabe, présentant un défaut génétique du récepteur LDL, est le modèle animal pour l'hypercholestérolémie familiale humaine homozygote. L'équipe de Goldstein et Brown (Kita et al., 1982) a montré que cette déficience génétique conduit simultanément à une hyperproduction de LDL (par hyperconversion des VLDL en IDL puis LDL) et à une diminution de la clairance de ces LDL. Ceci conduit à une augmentation très importante des LDL plasmatiques.

L'équipe de Scanu (Hummel et al., 1990), découvre une famille de singes rhésus présentant une hypercholestérolémie associée à une déficience en récepteur LDL. Les singes atteints sont hétérozygotes pour

une mutation non-sens dans l'exon 6 du gène du récepteur LDL. Aucun récepteur n'est synthétisé. La découverte de ce modèle de primate, plus proche de celui de l'homme que ne l'est le lapin Watanabe, sera utile pour étudier les relations entre le récepteur LDL et le métabolisme des lipoprotéines. Ce modèle permettra aussi sans doute d'étudier l'efficacité de régimes ou de médicaments dans le traitement de l'hypercholestérolémie familiale humaine.

II.5.2. Classe II : défaut de maturation du précurseur

Les récepteurs mutants sont synthétisés sous forme de précurseurs mais migrent très lentement, ou pas du tout, du reticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Ils n'atteignent pas la surface cellulaire. Ceci s'expliquerait par une conformation anormale ou, pour certains, par un défaut de clivage de la séquence signal NH₂-terminale.

Une délétion de six bases dans l'exon 2 conduit à l'omission de 2 acides aminés en position 26 et 27 de la première séquence répétée riche en cystéines. Cette délétion diminue la distance entre 2 résidus de cystéine et cela altère probablement les ponts disulfures et la conformation du récepteur. Le transport cellulaire est ralenti mais le récepteur fixe correctement les LDL : ceci confirme que la première séquence répétée n'est pas nécessaire pour la fixation des LDL à leur récepteur (Leitersdorf et al., 1988).

Leitersdorf et al. (1989b) ont caractérisé les 24 allèles mutants chez 12 Afrikaners homozygotes pour l'hypercholestérolémie familiale. Ils ont identifié deux mutations présentes dans plus de 95% des gènes de leur échantillon. Ces deux mutations sont des substitutions de bases conduisant au changement d'un seul acide aminé.

Pour l'une des mutations, le précurseur est normalement synthétisé et il subit une maturation retardée. Le récepteur LDL qui en résulte ne fixe pas les LDL.

Le deuxième allèle mutant produit un précurseur dont la maturation est plus lente et qui est rapidement dégradé.

Knight et al. (1989) décrivent des expérimentations réalisées sur les fibroblastes de peau provenant d'un sujet homozygote pour l'hypercholestérolémie familiale. Ces cellules présentent non seulement une maturation plus lente (mais pratiquement complète) du précurseur du récepteur LDL, mais en plus elles fixent beaucoup moins les VLDL et les LDL que des cellules normales. La mutation serait sur une région encore non localisée qui affecterait la structure du récepteur LDL.

En 1989, Hobbs et al. décrivent une mutation ponctuelle dans la quatrième séquence répétée du premier domaine (domaine de fixation) du récepteur LDL. Le récepteur mutant fixe les VLDL mais non les LDL, la maturation du précurseur est ralentie.

Cette équipe montre aussi l'héritage concomitant d'un gène dominant inconnu qui diminue l'hypercholestérolémie. Ce gène dominant donne des hétérozygotes pour une mutation du récepteur LDL qui sont normocholestérolémiques.

Une mutation ponctuelle, dans la séquence répétée C du domaine présentant une homologie de structure avec le précurseur de l'EGF, affecte la maturation du récepteur LDL et la fixation des LDL. C'est la première fois qu'est montrée l'influence de la séquence C sur la fixation des LDL (Soutar et al., 1989).

Plus récemment, deux mutations ont été décrites dans la population des canadiens français (Leitersdorf et al., 1990) :

- une substitution dans la cinquième séquence répétée du domaine de fixation qui conduit au remplacement d'un acide aminé basique contre un résidu acide,
- une substitution dans la séquence C du précurseur de l'EGF conduisant au remplacement d'une cystéine.

Ces deux mutations produisent un récepteur qui reste concentré dans le reticulum endoplasmique.

II.5.3. Classe III : précurseur mature - fixation anormale des LDL

Ces récepteurs mutants atteignent normalement la surface cellulaire. Ils sont reconnus par l'anticorps monoclonal Ig-C7, mais fixent moins de 15% du taux normal de LDL (Beisiegel et al., 1981).

II.5.4. Classe IV : précurseur mature, fixation des LDL, internalisation anormale du complexe

Pour un sujet étudié (Lehrman et al., 1985b), une large délétion élimine complètement 2 exons et partiellement un exon codant pour la région transmembranaire et la partie COOH-terminale cytoplasmique. Cette délétion résulte d'une recombinaison entre deux séquences Alu orientées dans des directions opposées. Une large proportion des récepteurs tronqués est excrétée. La petite fraction adhérente à la surface cellulaire fixe les LDL mais l'absence du domaine cytoplasmique empêche les récepteurs de se concentrer dans les puits recouverts.

Lehrman et al. (1985a) ont décrit deux autres mutations de cette classe :

- substitution d'une base changeant un codon tryptophane en un codon stop. Le domaine cytoplasmique n'a plus que deux acides aminés.
- duplication de quatre bases conduisant à une altération du cadre de lecture. Le domaine cytoplasmique compte huit résidus d'acide aminé supplémentaires.

En Finlande a été décrite une large délétion de 9500 bases de l'intron 15 à l'exon 18 (Aalto-Setälä et al., 1989b).

L'internalisation des LDL par les cellules est défectueuse.

Une nouvelle classe de mutations semble se constituer avec des mutations conduisant à une rapide dégradation du récepteur mature (Funahashi et al., 1988).

Une recombinaison entre 2 séquences Alu répétitives des exons 6 et 14 du gène du récepteur LDL conduit à une délétion presque complète de la partie codant pour le domaine homologue au précurseur de l'EGF. Le récepteur montre une capacité moindre à se dissocier de la LDL à pH acide. Le recyclage du récepteur est alors défectueux (Miyake et al., 1989).

II.6. Régulation du récepteur LDL

II.6.1. Régulation de la transcription du gène du récepteur LDL

Dès 1987, la région promotrice du gène du récepteur LDL a été partiellement caractérisée (Südhof et al., 1987).

Par des expériences de transfection de gènes, la région minimale de DNA à laquelle peut être assignée l'activité basale du promoteur ainsi que la régulation par les stéroïdes, a été localisée en amont du site de synthèse du mRNA. Il s'agit d'une séquence de 177 paires de bases qui contient trois séquences répétées imparfaites de 16 paires de bases chacune et deux séquences ressemblant à des séquences TATA (séquences TATA-like), de 7 paires de bases chacune. Les 3 séquences répétées, ainsi que la séquence TATA-like la plus en amont du site d'initiation de la transcription, sont nécessaires à l'expression maximale du gène.

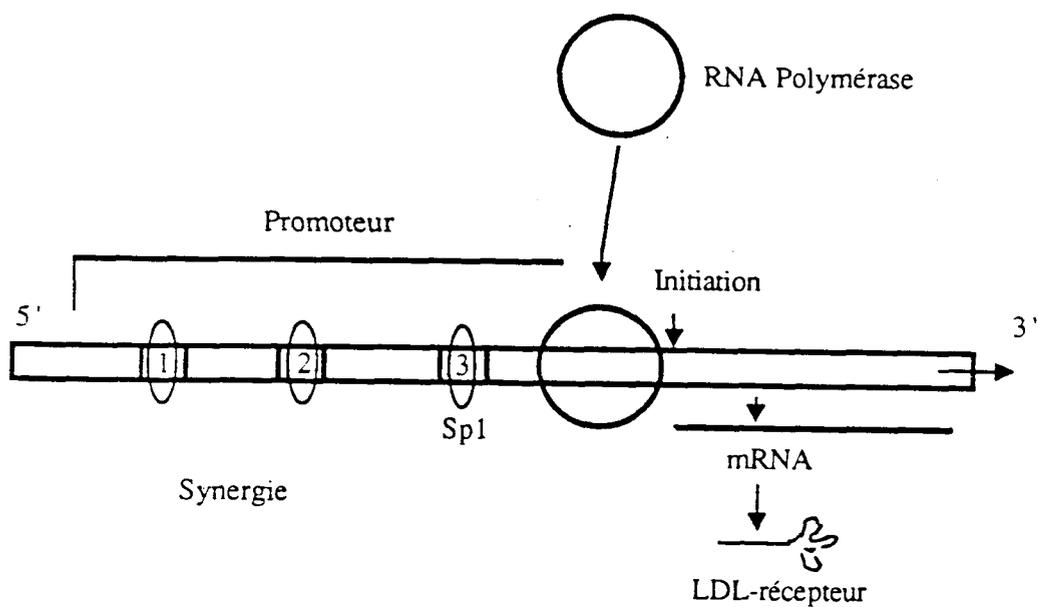
Les séquences répétées 1 et 3 sont des sites de fixation du facteur de transcription Sp1 qui augmente de 10 à 15 fois le taux de transcription par la RNA polymérase II (Kadonaga et al., 1986).

Les séquences répétées 2 et 3 fonctionnent comme des éléments de régulation par les stéroïdes. Les stéroïdes pourraient réprimer la transcription du gène du récepteur LDL par une compétition entre un répresseur contrôlé par les stéroïdes et un effecteur tel que Sp1.

La même équipe propose en 1988 (Dawson et al., 1988) un modèle pour la régulation de la transcription du gène (Figure 13).

En absence de stéroïdes, la séquence répétée 2 fixe un effecteur de transcription ayant une action synergique avec Sp1 se fixant sur les séquences 1 et 3.

En absence de stérols



En présence de stérols •

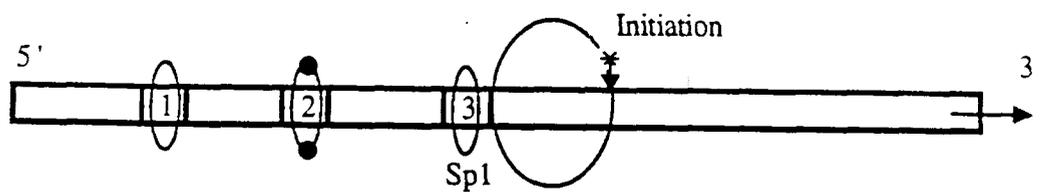


Figure 13 : Modèle de régulation du gène du récepteur LDL.
D'après Dawson et al., 1988.

Une mutation dans cette séquence 2 diminue l'activité promotrice, même en absence de stérols prouvant donc que cette séquence répétée fixe forcément un effecteur positif de transcription.

En présence de stérols, la séquence 2 perd son activité positive (le facteur de transcription ne se fixe plus ou il n'est plus actif sur le transcrit) et inactive la séquence 3 :

- soit une protéine se fixe sur la séquence 2 et peut, en présence de stérols, servir d'inhibiteur à la séquence 3,
- soit une seconde protéine se fixe sur la séquence 2, déplaçant le facteur de transcription positif et inhibant l'activité des sites de fixation de Sp1.

Smith et al. (1990) ont identifié, par des expériences de mutations dirigées, les dix nucléotides de la séquence répétée 2 indispensables pour l'activité de régulation par les stérols.

Un mécanisme similaire existe au niveau du promoteur de l'HMG CoA réductase : un élément de régulation par les stérols (SRE pour Sterol Regulatory Element), identique à la séquence répétée 2 du promoteur du gène du récepteur LDL, fonctionne comme un élément positif. Cependant, une mutation dans cette séquence ne diminue pas la transcription mais empêche la répression par les stérols, conduisant au phénotype d'opérateur constitutif. Cette séquence exerce donc un effet négatif sur la transcription dépendant des stérols (Osborne et al., 1988).

Il semblerait donc qu'un facteur commun, probablement une protéine unique, est impliqué dans la régulation du gène du récepteur LDL et du gène de l'HMG CoA réductase. Ce facteur se fixerait directement sur le SRE ou régulerait l'activité d'autres facteurs se liant au SRE.

Une régulation coordonnée de ces gènes a été montrée sur les cellules HepG2 par Molowa et Cimis en 1989.

Le ketoconazole, drogue antifongique, lève l'inhibition de l'activité promotrice du gène du récepteur LDL provoquée par les LDL et le sérum, mais non l'inhibition par le 25-hydroxycholestérol. Ces résultats suggèrent que le cholestérol transporté par les lipoprotéines sériques est métabolisé en un effecteur négatif. Ce métabolisme est inhibé par le ketoconazole (Takagi et al., 1989).

Rajavashisth et al. (1990) ont utilisé un oligonucléotide contenant le SRE pour étudier par hybridation une librairie de cDNA de cellules d'hépatome humain. Un clone, codant pour une protéine se fixant à l'oligonucléotide SRE, fut isolé. Cette protéine contient sept motifs en doigts de zinc dont la fixation au DNA est régulée de façon positive par les stérols. Ces propriétés suggèrent fortement un rôle de cette protéine dans le contrôle de la transcription par les stérols.

II.6.2. Les autres facteurs physiologiques régulant la transcription du gène du récepteur LDL

Plusieurs études, dont celles de Knight et al. (1987), ont suggéré qu'il existait des facteurs de régulation de la synthèse du récepteur LDL non directement liés au métabolisme du cholestérol.

Un certain nombre de changements physiologiques, liés à la croissance cellulaire et au contrôle hormonal, régulent la transcription du gène du récepteur LDL par des mécanismes ne dépendant pas seulement de variations du pool intracellulaire de stérols régulateurs.

Les résultats de Mazzone et al. (1989-1990) indiquent que les mécanismes de régulation par la croissance cellulaire et par les stérols doivent interagir pour moduler l'expression du récepteur LDL des fibroblastes. En effet, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et l'insuline activent tous deux la croissance cellulaire, et produisent une augmentation rapide de la transcription du gène du récepteur LDL. L'Actinomycine D empêche complètement l'augmentation du taux de mRNA du récepteur LDL par le PDGF, prouvant que la stimulation se faisait au niveau de la transcription.

Dans les cellules HepG2, l'insuline augmente le taux de mRNA du récepteur LDL et compense l'effet suppresseur des LDL exogènes, suggérant que l'hormone pourrait avoir la priorité sur le mécanisme de régulation par les stérols (Wade et al., 1989).

La transcription continue du récepteur LDL, nécessaire au maintien d'un taux équilibré des mRNA de cette protéine, requiert la synthèse d'une autre protéine (facteur positif) inhibée après 24 heures par de faibles concentrations de LDL (moins de 5% de la concentration

plasmatique normale) et les stérols exogènes. Par contre, l'augmentation rapide (après 1 heure) de l'expression du gène du récepteur (dosage des mRNA) des lymphocytes cultivés en sérum dépourvu en lipoprotéines, est indépendante de la synthèse d'une protéine et n'est réprimée ni par les LDL, ni par les stérols (Cuthbert et al., 1989).

Les cellules monocytaires leucémiques humaines (lignée THP-1) ont les mêmes propriétés que les macrophages. Lors de la différenciation des monocytes en macrophages, l'activité du récepteur spécifique des LDL diminue. Le traitement des cellules THP-1 par des esters de phorbol conduit à une rapide augmentation des mRNA du récepteur LDL induite par une protéine kinase C (PKC). L'induction de la transcription est aussi réalisée lors de l'incubation des cellules avec la cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique. Ces résultats suggèrent la participation d'une protéine labile dans la répression de la transcription. La PKC phosphorylerait cette protéine négative labile. Cela la convertirait en une forme incapable de se fixer sur l'élément de transcription positif et lèverait l'inhibition de la transcription (Auwerx et al., 1989a).

Les travaux de Leitersdorf et al. (1989a) confirment les précédents résultats. Ils montrent, au niveau de lignées de cellules cancéreuses (U87 MG), que le gène du récepteur LDL est, la plupart du temps, fortement réprimé, probablement par une protéine labile.

Les travaux de Filipovic et Buddecke en 1986, puis de Eckardt et al. (1988), ont montré que les antagonistes de la calmoduline augmentent sélectivement le taux de mRNA du récepteur LDL des fibroblastes humains. La calmoduline est une protéine cytoplasmique et nucléaire fixant le calcium. Dans le noyau, elle module la phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation de la transcription (Bachs et Carafoli, 1987).

Golos et Strauss, en 1987, rapportent que le gène du récepteur LDL des cellules "granulosa" humaines est activé par l'AMP cyclique (AMPc) qui agirait sur une séquence régulatrice du gène du récepteur LDL pour en augmenter la transcription.

Middleton et Middleton (1990) confirment ce résultat sur cellules musculaires lisses et fibroblastes de peau.

Auwerx et al. (1989b) ont incubé des cellules THP-1 avec des composés activant la PKC, ou provoquant le relargage du calcium intracellulaire, ou augmentant l'AMPc intracellulaire. Ils ont montré que l'expression du gène du récepteur LDL est fortement stimulée par chacun de ces systèmes de seconds messagers.

Au contraire, sur des cellules HepG2, l'AMPc réduit l'activité des récepteurs LDL et de l'HMG CoA réductase (Mazière et al., 1988).

A la vue de ces résultats, Wade et al. (1989) ont suggéré que l'insuline, réduisant le taux d'AMPc, lève la répression de la transcription induite par l'AMPc et, de ce fait, augmente l'expression du gène du récepteur LDL.

Une hypercholestérolémie est observée lors d'hypothyroïdisme chez l'homme (Kuusi et al., 1988a), ainsi que chez le rat lors d'hypothyroïdisme expérimental (Scarabottolo et al., 1986).

Dès 1979, Chait et al. montraient que la dégradation des LDL par les fibroblastes humains en culture était augmentée par la triiodothyronine. Dans ces conditions le nombre de récepteurs LDL à la surface cellulaire est augmenté (Salter et al., 1988).

Des doses pharmacologiques d'oestrogènes stimulent :

- l'expression du récepteur LDL par augmentation des mRNA,
- la captation des LDL par le foie.

Les principales études de l'équipe de Goldstein et Brown ont été réalisées sur des rats ou des lapins auxquels était administré de l'oestradiol ou un de ses dérivés (Kovanen et al., 1979 ; Windler et al., 1980 ; Ma et al., 1986b).

Ainsi l'expression du récepteur LDL doit être sous le contrôle de métabolites intracellulaires du cholestérol ainsi que de signaux externes opérant par l'intermédiaire de seconds messagers.

La complexité des contrôles de la transcription reflète clairement l'importance de ce gène dans les fonctions cellulaires.

III. L'APOLIPOPROTEINE B-100

L'apolipoprotéine B-100 (apoB-100) est la protéine majeure des LDL.

C'est la principale protéine de transport du cholestérol plasmatique. L'apoB est un constituant des lipoprotéines hépatiques, les VLDL. Elle reste liée à la particule jusqu'à sa transformation en LDL et son catabolisme.

L'apoB-100 est le ligand du récepteur LDL, elle est donc très importante dans le métabolisme du cholestérol.

Les taux plasmatiques élevés d'apoB-100 des LDL sont corrélés avec des risques accrus de maladies cardio-vasculaires.

III.1. La structure de l'apolipoprotéine B-100

De par sa taille, son insolubilité, et sa tendance à l'agrégation, peu d'informations étaient à notre disposition avant 1986 concernant la structure primaire de la protéine. L'utilisation de clones de cDNA a permis à deux équipes de publier la séquence complète de l'apoB-100 humaine (Yang et al., 1986 ; Knott et al., 1986).

La protéine mature est composée de 4536 acides aminés et sa masse moléculaire calculée est de 512 937. Une masse de 550 000 avait été trouvée par électrophorèse en SDS. La différence est probablement due à la glycosylation. 8 à 10% de la masse totale de l'apoB-100 sont constitués d'oligosaccharides liés à la protéine par des liaisons de type N. 20 sites potentiels de N-glycosylation sont distribués sur toute la longueur de la protéine avec une concentration plus importante autour des résidus 3197-3438.

L'apoB est composée de séquences répétées. Yang et al. (1986) en concluent que la séquence de l'apoB-100 dérive pratiquement entièrement de duplications internes du gène.

L'apoB est phosphorylée sur les résidus de sérine et tyrosine.

Des coupures enzymatiques par la trypsine libèrent de façon reproductible cinq domaines. L'accessibilité des peptides à la trypsine dépend de la conformation de l'apoB-100 dans les LDL, déterminée par ses interactions avec l'environnement lipidique.

De nombreux résidus cystéine sont rassemblés du côté NH₂-terminal permettant la stabilité de la structure de l'apoB-100 dans les LDL par la formation de ponts disulfures.

La structure secondaire de l'apoB est constituée à :

- 43% d'hélices alpha,
- 21% de feuillets bêta,
- 20% de structure en pelote statistique,
- 16% de coudes bêta.

Yang et al. (1989) ont proposé un modèle de la conformation de l'apoB-100 dans les LDL (Figure 14).

Des travaux de Chen et al. (1989) ont montré que l'expression des domaines de fixation au récepteur LDL est différente pour l'apoB-100 dans les LDL et dans les VLDL. Cela s'explique par des changements de conformation et d'environnement de l'apoB-100 quand, lors du catabolisme, les VLDL sont transformées en LDL par lipolyse.

Il a été récemment montré dans notre équipe (Agnani, 1989) que les lipides, les apos E et C-III de particules complexes masquent les sites de fixation de l'apoB à son récepteur.

Les LpB:E se fixent plus sur les cellules que les LpB car l'apoE a plus d'affinité pour les sites récepteurs.

Par contre, l'apoC-III des LpB:C-III inhibe presque complètement la fixation de ces particules aux cellules.

Les VLDL hypertriglycéridémiques après trypsination ne se fixent plus au récepteur LDL et ne répriment plus l'activité de l'HMG CoA réductase de fibroblastes humains normaux, car elles n'ont plus d'apoE fonctionnelles. L'intégration d'un peptide synthétique (acides aminés (AA) 3345-3381 de l'apoB) dans les VLDL restaure l'inhibition de l'activité de l'HMG CoA réductase. Ce peptide synthétique contient donc un domaine pouvant se fixer sur les récepteurs LDL des fibroblastes (Yang et al., 1986).

Une seule région, englobant la jonction T2/T3 (T2 et T3 sont des fragments libérés par la thrombine), semble impliquée dans l'interaction avec le récepteur LDL (Milne et al., 1989).

D'autres domaines de fixation ne sont cependant pas à exclure (Yang et al., 1986).

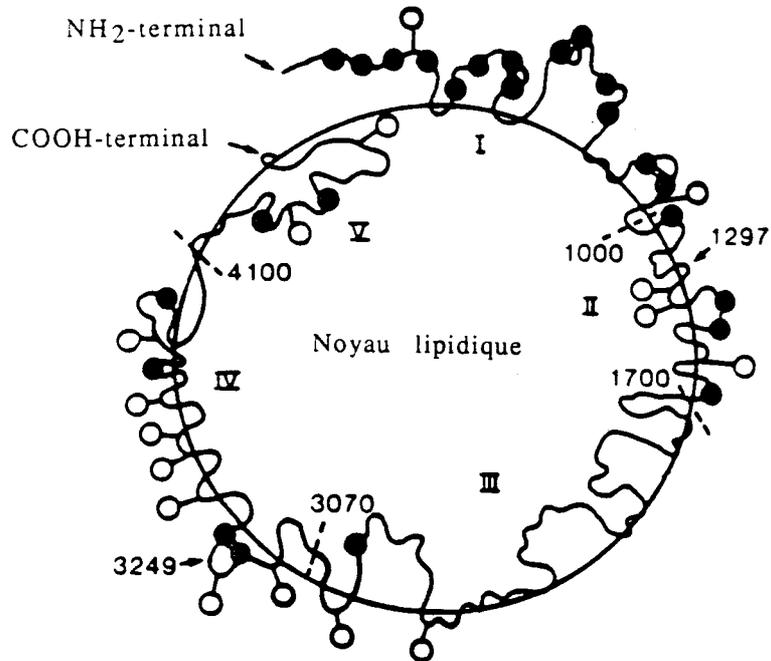


Figure 14 : Représentation schématique de l'apoB-100 dans les LDL.
D'après Yang et al., 1989.

Les régions libérées par action de la trypsine sont dessinées à l'extérieur du noyau lipidique, alors que les régions non libérées par la trypsine sont dessinées dans la masse lipidique de la particule.

Les cinq domaines hypothétiques de l'apoB-100 sont délimités par des pointillés.

○ : sucres

● : résidus cystéine.

Law et Scott (1990) ont comparé la séquence nucléotidique et protéique de deux régions de l'apoB-100 de sept espèces (homme, porc, lapin, rat, hamster syrien, souris, poulet).

La séquence renfermant de nombreux résidus basiques entre les acides aminés 3359 et 3367 est phylogénétiquement bien conservée et serait une région systématique impliquée dans l'interaction apoB-récepteur LDL.

La deuxième séquence renfermant de nombreux résidus hydrophiles entre les acides aminés 3147 et 3154 devient de plus en plus basique du poulet vers l'homme, impliquant peut-être un rôle important de cette séquence dans la fixation des LDL humaines à leur récepteur.

III.2. Le gène de l'apolipoprotéine B-100

Le gène de l'apoB est localisé sur le bras court du chromosome 2 (Knott et al., 1985). La région codante est de 43 kilobases et contient 29 exons (Figure 15).

Les 25 premiers exons codent pour la partie NH₂-terminale (le 1/3 de la protéine). La partie codante COOH-terminale est codée par 4 exons.

Les introns contiennent des séquences Alu susceptibles, par des appariements, de provoquer de larges délétions.

Du côté 3' du gène de l'apoB existe une région minisatellite hypervariable riche en nucléotides A et T. Cette région de 500 à 800 paires de bases est composée de séquences répétées en tandem de 11-16 paires de bases (Huang et Breslow, 1987).

Le séquençage direct et l'amplification de ce segment indiquent la présence de 14 allèles différents (Boerwinckle et al., 1989).

Le gène de l'apoB est exprimé dans les cellules de l'intestin et du foie. La forme intestinale de l'apoB est l'apoB-48, c'est à dire 48% de la masse de l'apoB-100 hépatique. L'apoB-48 dérive du même gène que l'apoB-100. Elle contient la moitié amino-terminale de l'apoB-100 et se termine par le résidu 2152 de l'apoB-100 (Figure 15).

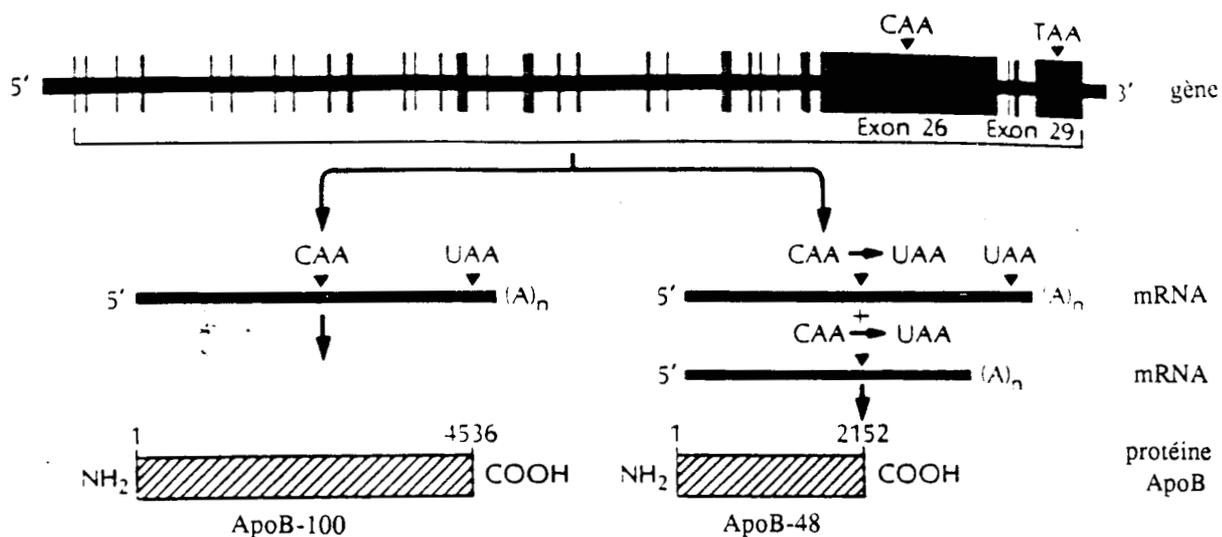


Figure 15 : Organisation du gène de l'apoB et origine des mRNA de l'apoB-100 et de l'apoB-48.

D'après Scott, 1990.

■ : exon.

(A)_n : queue poly A.

Des variations physiologiques ou génétiques de la réaction d'édition du mRNA de l'apoB-48 conduit à la production d'apoB-100 par l'intestin. Chez l'homme, cela fournit une nouvelle source de LDL athérogènes (Scott, 1990).

III.3. Le métabolisme de l'apolipoprotéine B-100

L'apoB-100 est synthétisée dans le foie. Elle est indispensable à l'assemblage des VLDL et à leur sécrétion dans le plasma.

Les VLDL transportent les triglycérides aux tissus. Les particules qui en résultent, enrichies en esters de cholestérol, correspondent aux LDL. Les LDL vont délivrer le cholestérol aux tissus et au foie.

L'apoB-100 est synthétisée dans le reticulum endoplasmique rugueux où elle est associée à la membrane. Puis, elle est transportée à travers l'appareil de Golgi vers les vésicules de sécrétion. Des études immunologiques ont montré que l'assemblage des lipoprotéines contenant l'apoB-100 se fait à l'interface entre le RE rugueux et lisse. D'autres études ont montré que la maturation des lipoprotéines se fait dans l'appareil de Golgi. Les lipoprotéines contenant l'apoB-100 semblent donc être formées par l'association séquentielle de ses composants dans le RE et dans l'appareil de Golgi (Bamberger et Lane, 1990 ; Boren et al., 1990 ; Gibbons, 1990).

Cependant, la régulation de la synthèse, du transit intracellulaire et de la sécrétion de l'apoB-100 par le foie est encore mal connue.

Les études réalisées sur les cellules HepG2 tendent à démontrer que la régulation métabolique de la sécrétion des LDL se fait pendant ou après la traduction et non au niveau du gène ou de la stabilisation du mRNA de l'apoB (Dashti et al., 1989 ; Kosykh et al., 1988 ; Pullinger et al., 1989 ; Wong et al., 1989).

Des études plus récentes de Kardassis et al. (1990) portant sur le promoteur du gène de l'apoB permettent cependant d'identifier une séquence de DNA reconnue par un facteur de transcription.

Davis et al. (1989) ont montré récemment que des produits de dégradation de l'apoB étaient détectables dans le RE, suggérant que c'était le site de dégradation de l'apoB.

Sato et al. (1990) confirment les résultats précédents en montrant que les enzymes lysosomales ne participent pas à la dégradation de l'apoB-100 nouvellement synthétisée. Les LDL exogènes stimulent la dégradation de l'apoB, indépendamment d'une variation du contenu intracellulaire en cholestérol. La dégradation semble être le mécanisme le plus important dans la régulation de la sécrétion de l'apoB.

III.4. Les variations génétiques de l'apolipoprotéine B-100

III.4.1. Les polymorphismes antigéniques

Il existe des polymorphismes antigéniques de l'apoB (polymorphismes Ag), dûs à des variants de la protéine. Il n'est pas observé de changement dans la maturation post-traductionnelle de la protéine ni dans la composition lipidique des lipoprotéines contenant cette apoB (Tikkanen, 1987).

C'est par l'utilisation de sérum de patients polytransfusés que Blumberg et al. (1962) ont montré l'existence de ces variants.

Cinq loci, avec 2 allèles co-dominants chacun, sont définis dans le système de polymorphismes Ag : Ag (x/y), Ag (a₁/d), Ag (c/g), Ag (t/z), Ag (h/i) (Bütler et al., 1974).

Tikkanen et al. (1986) et Duriez et al. (1987a - 1987b) ont développé deux anticorps monoclonaux, le MB19 et le BIP45, qui permettent d'étudier le polymorphisme Ag (c/g). Ce polymorphisme est associé à de très faibles variations des concentrations plasmatiques en lipides dans la population étudiée. La cholestérolémie est très légèrement augmentée.

Le polymorphisme détecté par ces anticorps monoclonaux ne semble pas associé à une augmentation de la fréquence des maladies cardiovasculaires.

A ce jour, 4 des 5 sites antigéniques de l'apoB ont été localisés :

- AA 71 = Ag (c,g) (Ma et al., 1989 ; Young et Hubl, 1989),
- AA 591 = Ag (a₁,d) (Wang et al., 1988),
- AA 3611 = Ag (h,i) (Xu et al., 1989),
- AA 4154 = Ag (t,z) (Ma et al., 1987 ; Dunning et al., 1988).

III.4.2. Les polymorphismes de restriction

Grâce au clonage du gène de l'apoB humaine, un certain nombre de polymorphismes de restriction (RFLP) ont été décrits (Priestley et al., 1985 ; Barni et al., 1986 ; Huang et al., 1990). Ces polymorphismes sont la conséquence d'un changement dans la séquence DNA du gène de l'apoB (substitution, délétion, insertion qui créent ou détruisent le site de reconnaissance d'une enzyme de restriction).

Des études récentes tentent d'associer les RFLP à l'un ou l'autre des sites antigéniques de l'apoB (Ma et al., 1987 ; Dunning et al., 1988a - 1988b).

Le RFLP détecté par l'enzyme de restriction XbaI peut être associé au polymorphisme Ag (c/g) (Ma et al., 1987).

Il a été aussi associé à Ag (x/y) (Berg et al., 1986b).

Le polymorphisme de restriction détecté par l'enzyme XbaI est dû à la substitution d'une seule base dans la partie codante du gène. Apparaissant au niveau de la troisième base du codon 2488, elle n'altère pas la séquence en acides aminés. Cependant, les sujets normolipémiques, homozygotes pour l'allèle X₂ (site de coupure de XbaI) ont un cholestérol total et un LDL-cholestérol plus élevés que les sujets X₂X₁ et que les homozygotes X₁X₁. Ils présentent un FCR (Fractional Catabolic Rate, évaluation de la dégradation *in vivo* des substances injectées) et une dégradation des VLDL par les cellules mononucléaires *in vitro* plus faibles (Talmud et al., 1987 ; Houlston et al., 1988).

Ce polymorphisme serait associé à des changements d'acides aminés à un autre endroit de l'apoB, ce qui altérerait la fixation des LDL au récepteur LDL. Cela modulerait le catabolisme des LDL et contribuerait à la variabilité de la cholestérolémie chez les sujets normolipémiques.

Aalto-Setälä et al. (1989a) montrent que le polymorphisme génétique de l'apoB détecté par XbaI contribue à la détermination de la cholestérolémie chez les patients hétérozygotes pour l'hypercholestérolémie familiale.

Bien que ces polymorphismes soient associés à certaines variations des lipides plasmatiques, nous pouvons probablement affirmer qu'ils ne sont pas des déterminants majeurs du risque d'athérosclérose (Genest et al., 1990).

III.4.3. "La mutation 3500"

Soria et al. (1989) ont identifié une mutation au niveau du résidu 3500 de la séquence protéique de l'apoB-100 (la maladie peut être appelée communément : la mutation 3500).

Dès 1987, Innerarity et al., décrivaient leurs travaux réalisés sur les LDL d'un patient hypercholestérolémique (G. R.). Les LDL de ce patient se fixent moins bien que les LDL normales sur les fibroblastes humains normaux (Figure 16B). La clairance retardée des LDL conduit à une élévation modérée de la cholestérolémie (Figure 16A). Cet effet n'est pas associé à une composition lipidique ou à une structure anormale des LDL.

L'anticorps monoclonal MB47 (Weisgraber et al., 1988), dont l'épitope est situé entre les résidus 3350 et 3506 de l'apoB, se fixe avec plus d'affinité sur les LDL pathologiques que sur les LDL normales (Figure 16C).

Ils ont appelé cette maladie "Familial Defective apoB-100".

La mutation d'une guanosine en adénosine dans l'exon 26 du gène de l'apoB conduit à la substitution d'une arginine par une glutamine à la position 3500 de la séquence protéique. Cette mutation est à transmission dominante. Les patients étudiés sont hétérozygotes pour cette mutation.

La recherche de cette mutation au niveau du gène de l'apoB peut se faire par hybridation du DNA avec des oligonucléotides spécifiques. La région entourant le codon de l'acide aminé 3500 est amplifiée par Polymerase Chain Reaction (PCR) puis transférée sur nitrocellulose. Un oligonucléotide spécifique identifie l'allèle normal, alors qu'un autre oligonucléotide reconnaît l'allèle mutant (Figure 16D).

Tybjaerg-Hansen et al. (1990) ont étudié la fréquence de cette mutation chez 374 sujets britanniques hyperlipidémiques et 371 britanniques et scandinaves souffrant d'athérosclérose. 3% des sujets ayant une hypercholestérolémie familiale ou une hyperlipidémie non familiale présentent la mutation. Cette mutation est rare chez les patients souffrant d'athérosclérose.

La mutation 3500 n'a pas été trouvée chez 552 patients hypercholestérolémiques finlandais (Hämäläinen et al., 1990).

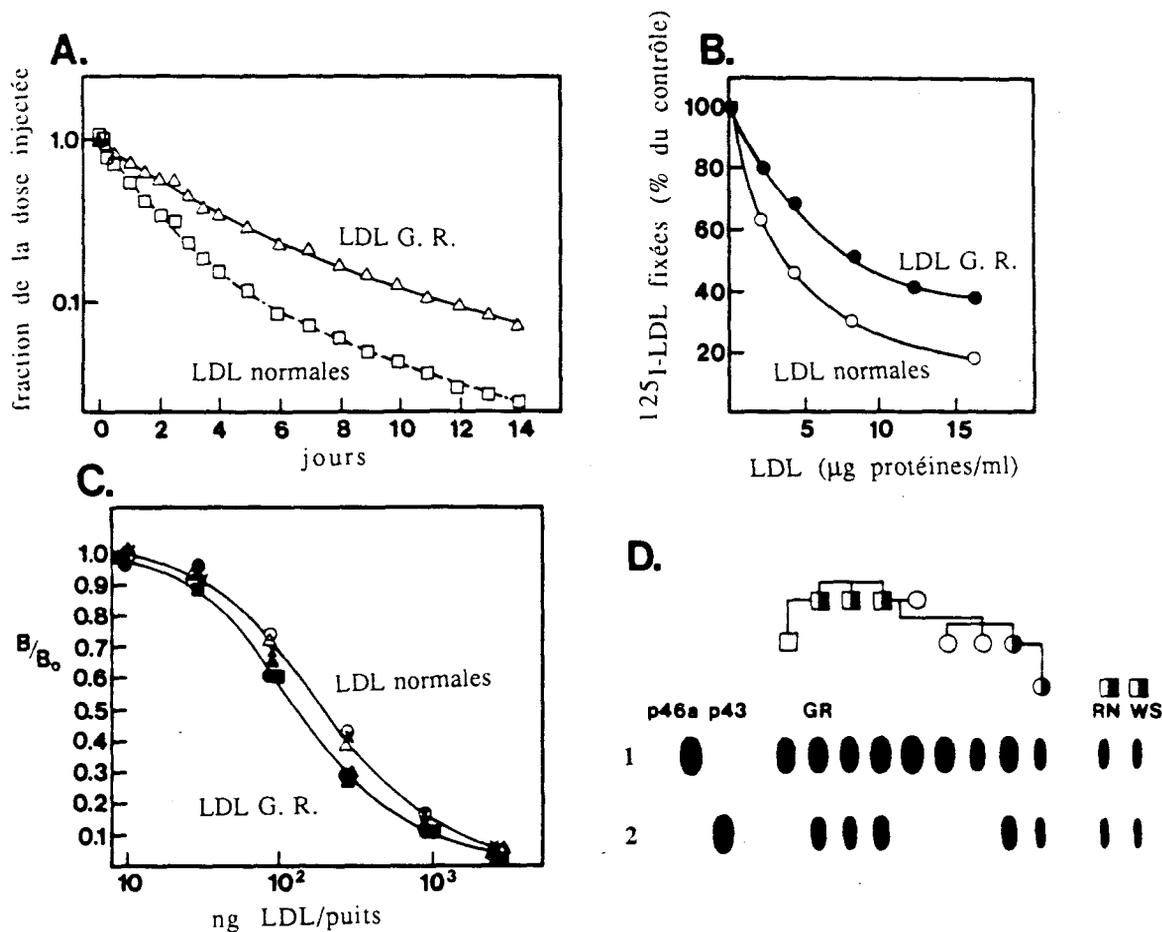


Figure 16 : Identification de la mutation 3500 de l'apolipoprotéine B.

A. Métabolisme in vivo de LDL injectées au patient G. R.

B. Compétition à 4°C entre des ^{125}I -LDL et des LDL normales ou des LDL de G. R., sur des fibroblastes humains normaux.

C. Fixation à l'anticorps monoclonal MB47. Compétition entre des ^{125}I -LDL et des LDL normales ou des LDL de G. R.

D. Détection de la mutation 3500 au niveau du gène de l'apoB par amplification du DNA puis hybridation avec un oligonucléotide spécifique de l'allèle normal (1) et un oligonucléotide spécifique de l'allèle mutant (2).

D'après Innerarity et al. 1990.

Les études actuelles de fréquence de cette mutation sont encore très partielles et limitées à quelques pays.

Dans les cas de mutation 3500, l'hypercholestérolémie observée est modérée. Cependant, une étude récente (Schuster et al., 1990) réalisée à Munich, montre que la cholestérolémie peut être élevée. Elle peut être comparable à celle observée chez les patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale. Les signes cliniques de ces deux maladies peuvent être les mêmes. La détermination du défaut génétique à la base de l'hypercholestérolémie observée paraît donc très importante et pourrait permettre, dans l'avenir, la mise en place de thérapies différenciées.

Une mutation au niveau de l'apoB a aussi été décrite chez des porcs spontanément hypercholestérolémiques. Les LDL de ces animaux ont moins d'affinité pour le récepteur LDL de porcs normaux. En plus de la mutation, une altération de la composition lipidique des lipoprotéines est observée (Lowe et al., 1988).

III.4.4. Le polymorphisme de la région 3' du gène

Une région très polymorphique, riche en bases A et T, a été détectée à l'extrémité 3' du gène de l'apoB (cf III.2.) (Huang et Breslow, 1987).

Par la technique d'amplification de gènes, un minimum de 12 allèles est observé. Ces allèles diffèrent par le nombre de séquences répétées (Boerwinckle et al., 1989).

Par des études familiales, Jenner et al. (1988) ont montré que ce polymorphisme est transmis et qu'il est stable au moins pendant plusieurs générations. Ils suggèrent que ce polymorphisme peut être un marqueur associé à des hyperlipidémies de type familial.

III.4.5. Les autres mutations

D'autres mutations sur l'apoB, conduisant à d'autres dyslipidémies, ont été récemment décrites.

L'insertion ou la délétion de trois acides aminés hydrophobes dans le peptide signal de l'apoB augmente la triglycéridémie (Xu et al., 1990).

Talmud et al. (1989) ont identifié deux mutations donnant des apoB tronquées dont la masse fait 40% ou 90% de la masse normale de l'apoB.

Les patients atteints souffrent d'hypobétalipoprotéïnémie. L'apoB-90 a plus d'affinité que l'apoB-100 pour le récepteur LDL. Son catabolisme est alors plus rapide.

La faible concentration plasmatique de l'apoB-40 n'est pas encore expliquée (Krul et al., 1989).

La recombinaison de deux séquences Alu dans les introns 20 et 21 provoque la délétion de l'exon 21 du gène de l'apoB. Le sujet atteint souffre d'hypobétalipoprotéïnémie (Huang et al., 1989).

D'autres mutations sur le gène de l'apoB sont décrites. Elles conduisent à des apoB de faible masse moléculaire. Elles sont probablement incapables d'assurer l'assemblage des lipoprotéines de basse et très basse densité (Young et al., 1990).

IV. LES AUTRES FACTEURS D'HYPERCHOLESTEROLEMIE

L'hypercholestérolémie liée au récepteur LDL est caractérisée par une augmentation isolée de la cholestérolémie, sans augmentation des triglycérides. L'hypercholestérolémie semble plus modérée dans les cas de mutation au niveau du gène de l'apoB.

Ces hypercholestérolémies sont toujours transmises d'une génération à une autre. Ceci explique le terme d'"hypercholestérolémie familiale" pour le déficit en récepteur, et le terme de "familial defective apoB-100" pour la mutation 3500 de l'apoB.

Le défaut du récepteur LDL ou de l'apoB n'est pas systématiquement vérifié. De nombreuses hypercholestérolémies essentielles ont sans doute d'autres causes. En effet, dans les pays industrialisés la fréquence des déficits en récepteurs LDL est de 1/500, alors que celle des hypercholestérolémies en général est bien plus élevée.

Ce sont les autres causes que nous envisagerons ici.

IV.1. L'hyperlipidémie familiale combinée

Une hypercholestérolémie modérée (2,50 à 3,0 g/l) paraît souvent correspondre à l'hyperlipidémie familiale combinée. Des concentrations plasmatiques élevées de LDL et/ou de VLDL sont observées.

Dans une même famille, différents phénotypes peuvent être associés. L'enquête va donc retrouver une hypercholestérolémie ou une hypertriglycéridémie isolée, ou une augmentation simultanée du cholestérol et des triglycérides (Kane et Havel, 1986). La découverte de l'hypertriglycéridémie permettra d'écarter la cause du déficit en récepteurs LDL ou de certaines mutations de l'apoB (en particulier la mutation 3500).

Le phénotype peut varier chez un même malade au cours du temps, et la fréquence de ces phénotypes dans une même famille est également répartie.

L'élévation des lipides n'apparaît qu'à l'âge adulte et le mode de transmission n'est pas encore bien déterminé (Grundy et al., 1987).

IV.2. La dysbétalipoprotéinémie

La dysbétalipoprotéinémie, phénotype III de la classification de Fredrickson, est une pathologie du ligand du récepteur LDL, mais concernant cette fois, les lipoprotéines riches en apoE. Elle est causée par la présence d'une forme mutante de l'apoE : l'apoE2.

Ayant moins d'affinité pour les récepteurs du foie, l'apoE2 conduit à une mauvaise épuration des IDL et donc à une élévation de la cholestérolémie (Havel, 1982 ; Kuusi et al., 1988b ; Smit et al., 1990).

Cette hypercholestérolémie est associée à une hypertriglycéridémie.

IV.3. L'hypercholestérolémie secondaire à d'autres pathologies

L'hypercholestérolémie peut être secondaire à d'autres pathologies.

L'hypothyroïdisme est associé à une hypercholestérolémie due à une augmentation des LDL plasmatiques (Redgrave et Snibson, 1977 ; Gross et al., 1987).

Des expériences *in vivo* sur des rats ont montré que l'hypercholestérolémie associée à l'hypothyroïdisme expérimental est due à une diminution du FCR des LDL (Scarabottolo et al., 1986).

Ceci est tout à fait en accord avec des expérimentations *in vitro* (Chait et al., 1979 ; Salter et al., 1988). L'expression des récepteurs LDL des fibroblastes est stimulée par incubation des cellules avec la triiodothyronine.

Certaines substances, qui miment l'effet des hormones thyroïdiennes, seraient des hypocholestérolémiantes potentiels (Underwood et al., 1986).

Chez les patients souffrant du diabète insulino- ou non-insulino-dépendant, le profil lipidique est modifié par rapport à des sujets non diabétiques (Howard, 1987).

L'hyperglycémie est associée principalement à une hypertriglycéridémie, et à un moindre degré, à une augmentation des LDL plasmatiques.

On observe une hyperproduction et une diminution de la clairance des VLDL. La conversion des VLDL en IDL puis LDL est augmentée. Le FCR de l'apoB associée aux LDL est diminué.

L'enrichissement des VLDL en triglycérides et leur glycosylation non enzymatique semblent altérer leur métabolisme (Steinbrecher et Witztum, 1984 ; Hiramatsu et al., 1985).

Pour les patients atteints du diabète insulino-dépendant, le traitement par l'insuline peut normaliser la production hépatique des VLDL et la clairance hépatique des LDL. *In vitro*, l'insuline potentialise les récepteurs LDL des fibroblastes en culture (Salter et al., 1987 ; Wade et al., 1989).

L'insuline joue donc un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines. Son mode d'action précis reste cependant à être élucidé.

Une protéine sérique, l'ASP (Acylation-Stimulating Protein) stimule la synthèse des triglycérides dans les fibroblastes de peau et les cellules adipeuses.

Des cellules cultivées à partir d'une biopsie de peau chez des patients hyperapobétalipoprotéiniques sont moins "répondantes" à ce facteur. *In vivo* cela provoquerait un afflux d'acides gras vers le foie et une hyperproduction de VLDL et de LDL (Cianflone, 1987 ; 1990).

IV.4. Les hormones sexuelles

La relative immunité de la femme vis-à-vis de la pathologie cardiovasculaire peut s'expliquer en partie par les différences, entre les deux sexes, de concentration et de composition des lipoprotéines circulantes.

Les résultats d'études épidémiologiques (Kannel et al., 1971 ; Kannel et al., 1976 ; Gordon et al., 1978) suggèrent que chez la femme, des concentrations normales en oestrogènes confèrent une certaine protection contre l'athérosclérose :

- triglycéridémie peu élevée,
- LDL-cholestérol significativement moins élevé que chez l'homme du même âge,
- HDL-cholestérol significativement plus élevé que chez l'homme avant 50 ans.

Les différences s'atténuent ensuite avec l'âge.

Les effets des oestrogènes sur les apolipoprotéines et les lipoprotéines ont été étudiés essentiellement sur les cellules HepG2 (Deefley et al., 1985).

L'incubation des cellules HepG2 avec des concentrations physiologiques d'oestradiol conduit à une augmentation de la sécrétion des apoA-I et C-II. L'apoC-II, activatrice de la lipoprotéine lipase, contribue à l'augmentation du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. L'oestradiol favoriserait la sécrétion des HDL par augmentation de synthèse de l'apoA-I. Les HDL sont impliquées dans le retour du cholestérol des tissus vers le foie.

Des études chez l'animal ont montré que les oestrogènes augmentent la captation des HDL par le foie (Chao et al., 1979 ; Kovanen et al., 1979) et des particules résiduelles des VLDL riches en apoE (Floren et al., 1981).

La ménopause s'accompagne de modifications importantes du profil lipidique de la femme par privation oestrogénique. L'administration d'oestrogènes, associés ou non à des progestatifs, permet de normaliser les effets secondaires de cette privation.

IV.5. L'âge

L'athérosclérose est une maladie affectant les artères de gros et moyen calibre. Le mécanisme de genèse de la plaque d'athérome est multifactoriel. Cependant, le facteur de risque central est l'hyperlipémie (Katz et Small, 1983). Ainsi, des études cliniques tentent de corréler positivement les autres facteurs de risques habituellement admis avec l'augmentation des lipides.

La cholestérolémie augmente régulièrement avec l'âge. Cependant, l'incidence de l'âge sur la cholestérolémie est moins importante chez la femme que chez l'homme (Simons et al., 1984).

Miller en 1984 fait une étude rétrospective des résultats publiés. Il en conclut que le catabolisme des LDL diminue avec l'âge par diminution de l'activité des récepteurs LDL tandis que la production des LDL varie peu.

Sur fibroblastes de peau en culture, le métabolisme des LDL diminue en fonction de l'âge du patient ayant subi la biopsie (Behrman et Wynn, 1984).

Inversement, Gylling et Miettinen (1988) n'observent, sur 15 ans, aucune variation des lipides sériques et du métabolisme du cholestérol chez des patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale.

Cependant il est difficile, dans une étude épidémiologique, d'apprécier l'influence de l'âge indépendamment des autres facteurs d'environnement (alimentation, exercice physique...).

IV.6. L'alimentation

Il apparaît que les excès de poids, et encore plus, l'obésité, sont corrélés positivement avec une élévation des lipides (cholestérol et triglycérides) et un risque accru d'accident cardiovasculaire (Simons et al., 1984).

L'étude de l'influence de l'alimentation sur le métabolisme des lipides est donc particulièrement importante.

Il existe une grande variabilité d'absorption intestinale du cholestérol d'un individu à l'autre (Miettinen et Kasaniemi, 1989). Elle peut varier de 20 à 80%, pour la même quantité ingérée.

Il existe une variabilité inter-individu de réponse à un régime riche en cholestérol. Cette variabilité est attribuable à la différence de précision des mécanismes de rétrocontrôle négatif qui diminuent la synthèse de cholestérol quand l'absorption de cholestérol alimentaire augmente (McNamara et al., 1987). 20 à 25% de la population seraient donc sensibles au cholestérol alimentaire et présenteraient une augmentation de la cholestérolémie quand la quantité de cholestérol apporté par l'alimentation est augmentée (Beynen et Katan, 1985). Cette hyper-réponse au cholestérol alimentaire est due à un défaut de rétrocontrôle de la synthèse endogène du cholestérol (McNamara et al., 1987).

Miettinen et al. (1988) rapportent que le phénotype de l'apoE est un facteur majeur impliqué dans la capacité de compenser l'apport excessif de cholestérol alimentaire. Ainsi, les sujets ayant l'apo E4/3 ou E4/4 sont plus sensibles à l'apport de cholestérol alimentaire que les sujets E2/2 ou E2/3.

Beaucoup d'études se sont intéressées à l'effet de la qualité des graisses ingérées sur le bilan lipidique.

Les acides gras polyinsaturés (AGI) semblent diminuer la concentration plasmatique du cholestérol associé aux LDL (Weintraub et al., 1988 ; Mensik et Katan, 1989).

Les graisses saturées (AGS) augmentent les LDL plasmatiques ainsi que les HDL (Knuiman et al., 1987).

Cependant l'acide stéarique (C18:0) apparaît aussi efficace que l'acide oléique (C18:1) pour baisser la cholestérolémie (Banome et Grundy, 1988).

L'ingestion d'une alimentation riche en sucres conduit à la diminution de la concentration plasmatique de LDL. L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis de démontrer que l'expression des épitopes de l'apoB-100 était modulée par ce régime. Les LDL isolées des sujets suivant ce régime sont plus vite métabolisées par des fibroblastes de peau en culture que les LDL témoins (Keidar et al., 1989).

Les études sur animaux ont permis d'étudier les mécanismes d'action du cholestérol alimentaire sur le métabolisme des LDL.

Chez le hamster, le catabolisme des LDL par le récepteur LDL hépatique est réduit quand la nourriture est riche en cholestérol. Cette diminution est encore plus importante avec une alimentation riche en acides gras saturés (Spady et Dietschy, 1988).

Chez cet animal, les acides gras saturés à chaînes courtes de l'alimentation augmentent la production hépatique des LDL et diminuent leur clairance par le récepteur B, E.

L'équilibre entre la production des LDL et leur clairance est modifié par le cholestérol alimentaire. Le degré du déséquilibre engendré est fonction de la qualité des graisses alimentaires (Woolett et al., 1989).

Chez les singes d'Afrique (Sorci-Thomas et al., 1989), une alimentation riche en cholestérol augmente la concentration en LDL cholestérol par une diminution de la clairance des lipoprotéines contenant l'apoB, mais non par augmentation de la production de ces lipoprotéines.

Chez l'homme, les mécanismes de modulation du métabolisme lipidique par le cholestérol alimentaire ne sont pas encore élucidés.

Cependant, le régime alimentaire peut être une première thérapeutique lors de la découverte d'une hypercholestérolémie essentielle. Connaissant l'importance du cholestérol dans la construction des cellules et particulièrement celles du cerveau, l'application d'un régime pauvre en cholestérol pourrait être catastrophique chez l'enfant. Par contre, cela peut être envisagé chez l'adulte.

L'alimentation devra plutôt être ramenée à des normes équilibrées.

Il faudrait donc augmenter l'apport des graisses insaturées par rapport aux graisses saturées.

V. L'APPROCHE PHARMACOLOGIQUE

Notre but ici n'est pas de faire une analyse détaillée des traitements. L'important est de noter que la recherche de nouveaux hypocholestérolémiants est basée sur notre connaissance du métabolisme du cholestérol et que ces traitements confirment les mécanismes de régulation avancés.

De nombreux normolipémiants sont disponibles. Ils agissent à différents niveaux du métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Tous les hypocholestérolémiants tendent à baisser la concentration des lipoprotéines athérogènes (LDL et VLDL). Une des solutions est de surexprimer le récepteur LDL du foie. Pour cela, il faut diminuer la concentration intracellulaire hépatique de cholestérol.

Il existe trois stratégies majeures pour une baisse pharmacologique de l'hypercholestérolémie.

V.1. Les résines séquestrantes

La première stratégie, la mieux étudiée, est l'utilisation de résines séquestrantes.

Les résines ingérées fixent le cholestérol alimentaire et les acides biliaires dans la lumière de l'intestin grêle. Les complexes insolubles ne peuvent être réabsorbés et sont directement éliminés dans les fèces. La circulation entérohépatique est interrompue. La conversion du cholestérol hépatique en acides biliaires par la 7-alpha-hydroxylase est activée. L'activité et la synthèse des récepteurs LDL sont alors augmentées, entraînant une diminution du cholestérol plasmatique par un catabolisme accru des LDL (Shepherd et al., 1980 ; Havel, 1988).

Les patients traités à la cholestyramine ont deux fois plus de récepteurs LDL exprimés au niveau hépatique que les patients non traités. Ceci a été montré par fixation de ^{125}I -LDL sur homogénat de foie (Rudling et al., 1990).

Des fibres alimentaires hydrosolubles ont un effet similaire :

- augmentation de l'excrétion des acides biliaires,

- diminution de la circulation entérohépatique du cholestérol (Miettinen et Tarpila, 1977).

Cependant, l'effet hypocholestérolémiant des résines est limité car elles activent simultanément l'activité de l'HMG CoA réductase. Il en résulte une augmentation de la synthèse endogène du cholestérol (Packard et Shepherd, 1982).

V.2. Les fibrates

Les fibrates agissent sur le métabolisme des triglycérides et du cholestérol. Cependant, les mécanismes d'actions ne sont encore qu'imparfaitement élucidés.

Ils sont hypotriglycéridémiants. Le fénofibrate semble inhiber la synthèse des VLDL (Clouet et Paris, 1980) et augmenter leur transformation en LDL par stimulation de la synthèse de l'apoC-II activatrice de la lipoprotéine lipase (Malmendier et al., 1989).

Ils sont hypocholestérolémiants. Le fénofibrate inhibe la synthèse hépatique du cholestérol (Krichevsky et al., 1979). Il augmente le catabolisme des LDL par la voie spécifique des récepteurs (Stewart et al., 1982).

Très récemment, Issemann et Green (1990) ont montré qu'il existait un récepteur nucléaire du clofibrate au niveau des cellules hépatiques de rats qui est activé par les composés (dont le clofibrate) initiant la prolifération des péroxisomes. Ce récepteur peut être classé dans la superfamille des récepteurs des hormones stéroïdes. Les mécanismes par lesquels les composés initiant la prolifération des préoxisomes régulent l'expression des gènes chez les rongeurs ne sont pas encore élucidés.

V.3. Les inhibiteurs de l'HMG CoA réductase

La plus récente des approches hypocholestérolémiantes utilise les inhibiteurs de l'HMG CoA réductase, enzyme clef de la synthèse endogène du cholestérol.

Ces substances réduisent sélectivement les LDL chez l'homme par augmentation de leur clairance par le foie (Bilheimer et al., 1983).

Chez le hamster et le lapin, cette réduction est réalisée par l'augmentation de la synthèse des mRNA du récepteur LDL des cellules hépatiques (Ma et al., 1986a).

Chez les sujets hétérozygotes pour l'hypercholestérolémie familiale, l'activité de l'HMG CoA réductase intestinale est réduite par rapport à celle des sujets sains. Cette inhibition est due aux concentrations élevées des LDL circulantes (Sodhi et al., 1980).

L'activité de l'HMG CoA réductase est encore diminuée sous traitement à la lovastatine (Freeman et al., 1988).

Raveh et al. (1990) observent une augmentation très significative de l'activité des récepteurs LDL des monocytes circulants. Ceci peut contribuer à l'action hypocholestérolémiante de l'inhibiteur de l'HMG CoA réductase.

Raveh et al. (1990) ne montrent aucun changement dans la structure et la composition des lipoprotéines de sujets hypercholestérolémiques (hypercholestérolémie familiale ou non) traités par la lovastatine.

Bard et al. (1990) montrent des modifications de concentration des particules lipoprotéiques. Le traitement à la pravastatine diminue le cholestérol associé aux LDL, l'apoB totale. L'étude des particules révèle une diminution des LpE:B et des LpC-III:B, et une augmentation des LpA-I.

Le fénofibrate a le même effet sur le bilan lipidique. Par contre il diminue de façon beaucoup plus importante les LpE:B et les LpC-III:B. Il diminue de façon modérée la LpA-I.

Chez les patients présentant une hypercholestérolémie modérée et des triglycérides normaux, la lovastatine diminue la production de l'apoB associée au LDL (Grundy et Vega, 1985).

Arad et al. (1990) suggèrent que chez les patients présentant une hyperlipidémie combinée, la lovastatine diminue la production directe de l'apoB liée au LDL et non la production d'apoB liée au VLDL ni la conversion VLDL -> LDL.

V.4. La "thérapie combinée"

L'utilisation des deux substances, résines et inhibiteurs de l'HMG CoA réductase, conduit à un effet synergique (Figure 17) (Leren et al., 1988 ; Tuomilehto et al., 1989).

La résine réduit le pool hépatique de cholestérol. L'inhibiteur de l'HMG CoA réductase prévient l'augmentation compensatrice de la synthèse endogène de cholestérol.

La mise en place de ces thérapies requiert toujours une alimentation adaptée pour obtenir l'effet maximal hypocholestérolémiant (diminution de la quantité totale de calories si nécessaire, diminution de l'apport alimentaire en lipides, augmentation de l'exercice physique...).

Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces thérapies sont tout à fait sûres et efficaces à long terme pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale.

L'étape suivante sera d'examiner si ces traitements peuvent être prescrits lors d'hypercholestérolémie modérée (Heber et al., 1987).

Enfin, des études épidémiologiques prospectives devraient montrer si la diminution de la cholestérolémie conduit à une diminution de l'incidence des maladies cardiovasculaires et ainsi montrer définitivement la relation entre la diminution de la cholestérolémie par la thérapeutique et la diminution des accidents cardiovasculaires.

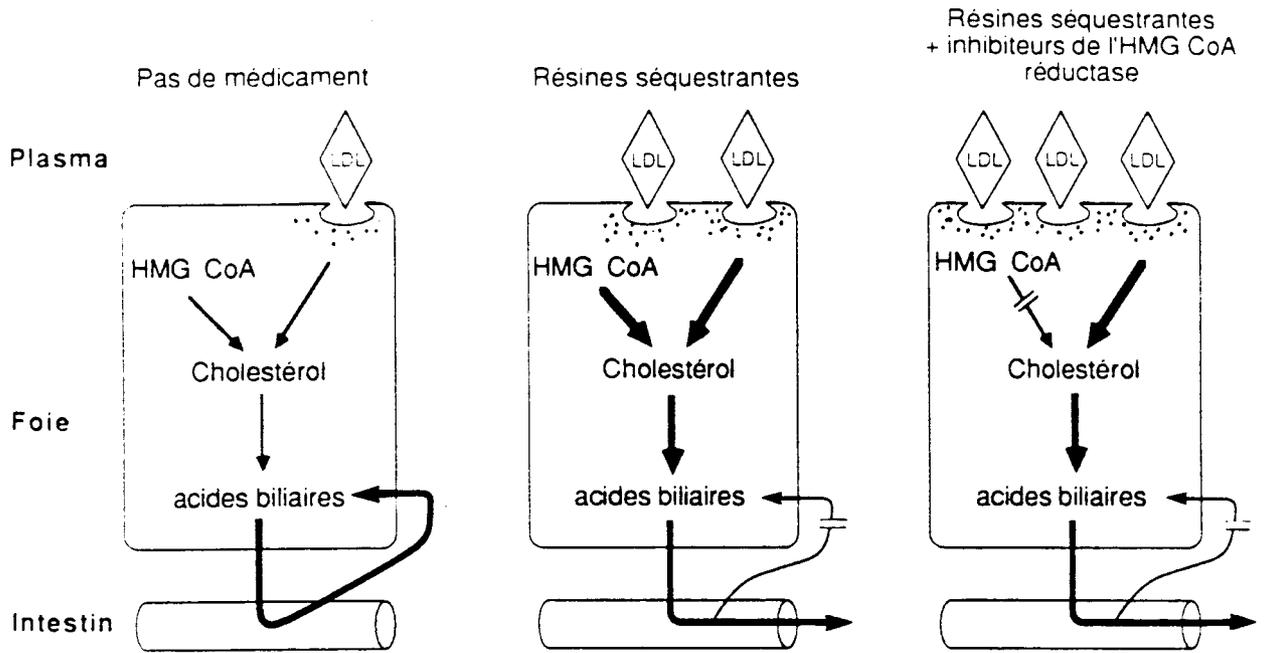


Figure 17 : Régulation de l'expression hépatique des récepteurs LDL lors d'une thérapie combinée : résines séquestrantes et inhibiteurs de l'HMG CoA réductase.

Le but de notre travail était d'étudier l'expression du récepteur LDL sur des cellules en culture *in vitro* provenant de patients hypercholestérolémiques classés hétérozygotes FH.

Nous avons donc appliqué les techniques sur lymphocytes et fibroblastes décrites dans la littérature (Benhamamouch et al., 1988 ; Goldstein et Brown, 1974 ; Ho et al., 1976a). Nous nous sommes rendus compte que, pour donner des résultats fiables, ces techniques devaient être standardisées dans chaque laboratoire où elles étaient utilisées. La première partie de notre travail consiste donc à la standardisation et à la mise en place de protocoles d'études fiables de l'expression du récepteur LDL de différents types cellulaires.

L'obtention des cellules est l'un des inconvénients majeurs de ces techniques. En effet la mise en culture des fibroblastes demande une biopsie de peau, et l'étude des lymphocytes ne peut se faire qu'une fois sur un prélèvement sanguin.

Notre but a donc été d'utiliser un modèle cellulaire dont l'obtention est aisée (une seule prise de sang) mais permettant un grand nombre d'expérimentations (culture des lymphocytes immortalisés par transformation virale). Nous avons donc expérimenté ce modèle cellulaire et discuté ses possibilités d'application.

CHAPITRE II

ETUDE DU RECEPTEUR LDL SUR DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES

Le récepteur LDL peut fixer les lipoprotéines contenant l'apoB et/ou l'apoE. L'étude de l'expression du récepteur LDL se fera donc grâce à l'utilisation d'un ligand naturel : les LDL.

Les lipoprotéines ont une très forte affinité pour leur récepteur. Des valeurs de constante de dissociation (Kd) de 10^{-9} à 10^{-10} M sont courantes.

L'activité des récepteurs LDL sera étudiée dans des conditions d'expression maximale, c'est-à-dire dans un milieu dépourvu en lipoprotéines pour ne pas réprimer la synthèse du récepteur, selon le type cellulaire :

- milieu de culture + sérum déficient en lipoprotéines (LPDS) (cellules HeLa, fibroblastes),
- milieu de culture + sérumalbumine bovine (SAB) (lymphocytes et lymphoblastes).

Dans ces conditions, l'expression du récepteur LDL reflète le génotype et nous ne faisons pas intervenir de conditions particulières de régulation de l'expression.

Cependant, la faible stimulation des récepteurs LDL obtenue après incubation des lymphocytes (cellules qui ne se divisent pas) en milieu de culture + SAB a conduit Benhamamouch (1988) à amplifier cette réponse par différents moyens :

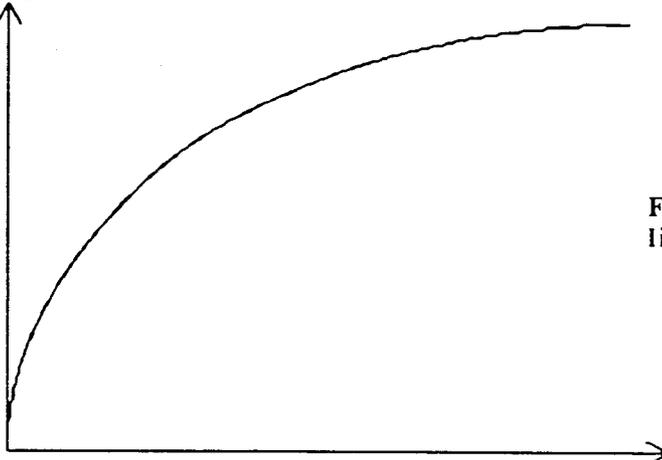
- en provoquant la prolifération des lymphocytes par l'action d'une lectine mitogène : la phytohémagglutinine A (PHA) (Cuthbert et Lipsky, 1984),
- en dérégulant la synthèse des récepteurs LDL par des inhibiteurs de la calmoduline (Filipovic et Buddecke, 1986),
- en stimulant l'efflux du cholestérol cellulaire sous l'action d'une sous-fraction des HDL : les HDL3 (Aviram et al., 1989).

Les résultats montrent qu'en présence de PHA et d'antagonistes de la calmoduline, les réponses sont très variables d'un individu à un autre.

Bien que nous n'en connaissions pas exactement les mécanismes, la stimulation reproductible des récepteurs LDL des lymphocytes est obtenue en incubant ces cellules pendant 72 heures à 37°C dans un milieu RPMI contenant de la SAB 1% et des HDL3 300 $\mu\text{g/ml}$.

A 4°C , seule la fixation du ligand sur les cellules a lieu, sans internalisation ni dégradation.

quantité de ligand fixé
= Bound (B)



Fixation cellulaire d'un ligand spécifique

concentration de ligand libre ≡ Free (F)
assimilée à la concentration de ligand ajouté

B/F (Bound/Free)

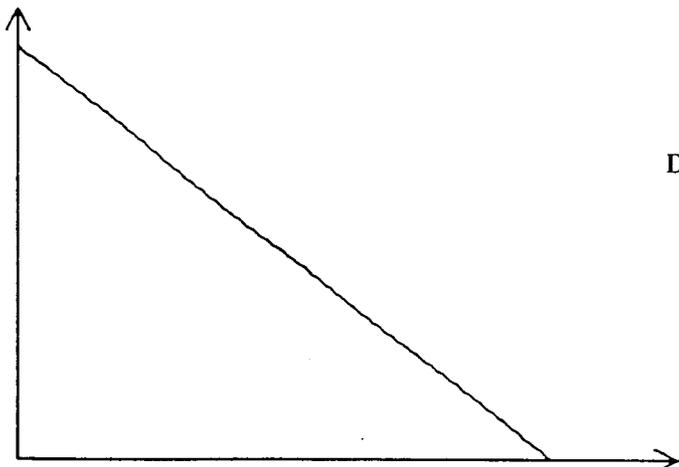


Diagramme de Scatchard

Bmax B (Bound)

$$B/F = - 1/Kd B + b$$

$$N = B_{max} (g) \times 6,02 \cdot 10^{23} / MM \text{ du ligand}$$

nombre de cellules pour l'essai

Kd = constante de dissociation en mole/l ou g/l

Bmax = quantité maximale de ligand fixé à saturation des sites

N = nombre apparent de sites de fixation par cellule

MM = masse moléculaire du ligand

Figure 1 : Représentation de Scatchard.

L'utilisation de ligands radiomarqués permet de mesurer l'affinité apparente et de tracer un graphe de Scatchard pour évaluer le nombre de sites de fixation du ligand à la surface cellulaire (Figure 1).

A 37°C, nous pouvons étudier le métabolisme du ligand par la cellule. Avec des LDL fluorescentes, nous pouvons étudier la fixation et l'internalisation.

L'utilisation de LDL marquées à l'Iode ^{125}I permet d'étudier en plus la dégradation.

I. ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS LDL SUR CELLULES HeLa

Les cellules HeLa Williams sont une lignée de cellules provenant d'un cancer humain de l'utérus. Elles ont des récepteurs LDL normaux et un métabolisme normal des lipoprotéines (Johnston et al., 1983).

Le but de notre étude était de mettre en place un modèle cellulaire d'étude des ligands du récepteur LDL et en particulier des LDL des patients hypercholestérolémiques.

I.1. Matériels et méthodes

I.1.1. La culture des cellules (Fiche technique n°9)

Les cellules sont cultivées en milieu DMEM contenant 10% v/v de sérum de veau foetal (SVF), dans des flacons de 80 cm².

Quand les cellules forment une culture confluyente, elles sont trypsinées etensemencées sur une surface plus importante. D'un grand flacon de culture peuvent êtreensemencés 18 puits de culture de 3,5 cm de diamètre.

4 heures après l'ensemencement, le milieu est aspiré puis remplacé par du milieu DMEM contenant 10% v/v de sérum déficient en lipoprotéines (LPDS) à la place du SVF.

Les cellules sont incubées pendant 48 heures (elles arrivent à confluence) dans ce milieu afin d'obtenir le maximum d'expression du récepteur LDL.

I.1.2. Les lipoprotéines

Les LDL ($1,030 < d < 1,053$) (Fiche technique n°1) sont marquées à l'Iode ¹²⁵I (Fiche technique n°5) selon la méthode de MacFarlane (1958).

Sur sept expérimentations, l'activité spécifique moyenne des LDL est de 380 ± 72 cpm/ng protéines.

I.1.3. Technique de dosage du récepteur LDL (Fiche technique n°11)

Nous avons principalement étudié l'expression du récepteur LDL par une technique de fixation à 4°C des ^{125}I -LDL.

Après 48 heures d'incubation en milieu DMEM/LPDS, les cellules sont mises en présence de 0,7 ml de DMEM/LPDS contenant des concentrations croissantes (1 à 50 $\mu\text{g/ml}$) de ^{125}I -LDL pendant 2 heures à 4°C.

La fixation non spécifique est mesurée en présence de ^{125}I -LDL et de LDL non marquées en excès (20 fois la concentration des ^{125}I -LDL).

Chaque point est réalisé en triple.

Les résultats sont exprimés en ng de protéines fixées par mg de protéines cellulaires.

I.2. Résultats

La figure 2 représente la courbe de fixation spécifique à 4°C de ^{125}I -LDL. C'est une courbe moyenne regroupant 5 expérimentations.

Le plateau de saturation est atteint à une concentration en ^{125}I -LDL comprise entre 20 et 30 $\mu\text{g/ml}$.

La fixation non spécifique (Figure 3) des ^{125}I -LDL par les cellules HeLa augmente linéairement en fonction de la concentration des lipoprotéines radiomarquées.

Le tableau I représente les valeurs de la constante de dissociation K_d et du nombre apparent de sites récepteurs (N) des LDL sur les cellules HeLa calculées selon la méthode de Scatchard dans 5 expériences.

Le K_d moyen est de $13,2 \pm 7,1$ nM. Le nombre de sites N est de 44400 ± 11400 . Ces valeurs sont très proches de celles obtenues précédemment dans le laboratoire (16 expérimentations) (Agnani, 1989) :

$$K_d = 12,8 \pm 3,2 \text{ nM}$$

$$N = 42664 \pm 6840.$$

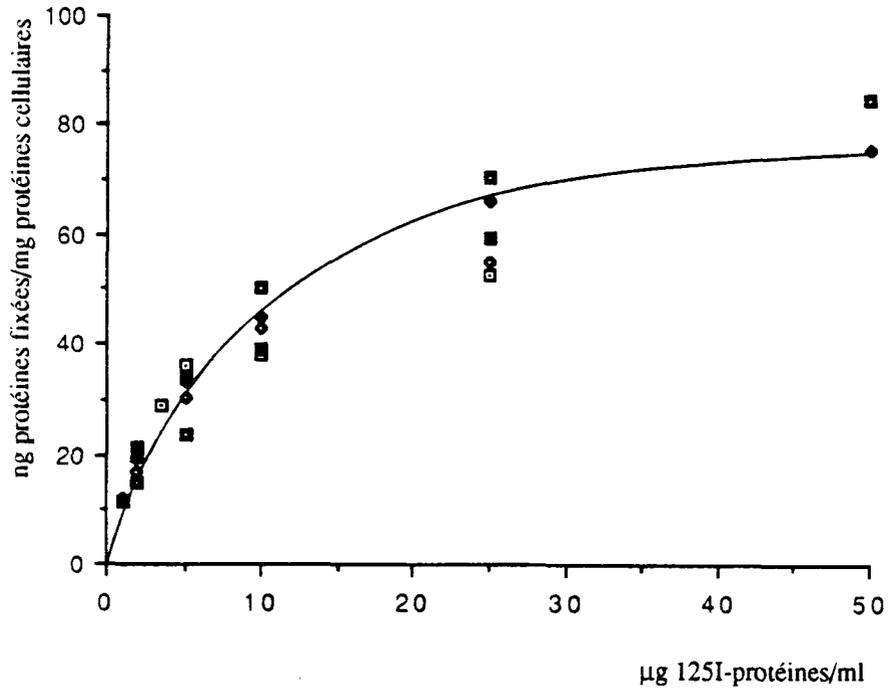


Figure 2 : Courbe moyenne de la fixation spécifique à 4°C de ^{125}I -LDL sur les cellules HeLa (5 expérimentations).

Les cellules HeLa sont incubées pendant 2 heures à 4°C en présence d'une concentration croissante de ^{125}I -LDL. La fixation non spécifique (^{125}I -LDL + excès de LDL non marquées) est déduite de la fixation totale (^{125}I -LDL) pour obtenir la fixation spécifique.

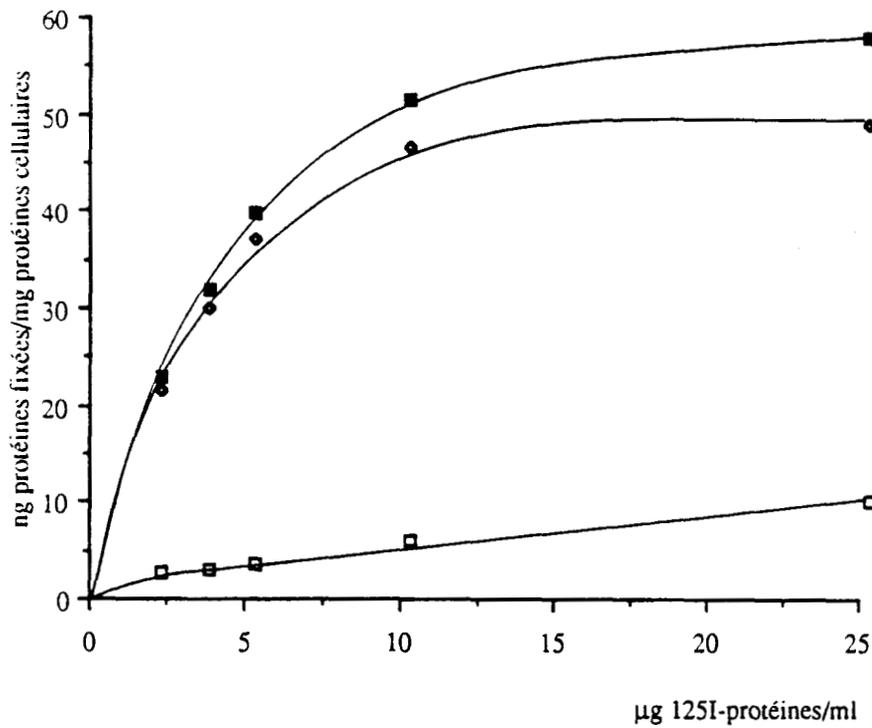


Figure 3 : Etude de la fixation des ¹²⁵I-LDL pendant 2 heures à 4°C sur les cellules HeLa.

La fixation spécifique est calculée par différence entre la fixation totale (¹²⁵I-LDL) et la fixation non spécifique (¹²⁵I-LDL + excès de LDL non marquées).

- fixation totale
- fixation spécifique
- fixation non spécifique

Kd n M	N
7,3	33000
13,1	48000
26,9	65000
9,4	37000
9,4	39000
13.2 ± 7,1	44400 ± 11400

Tableau I : Valeurs de la constante de dissociation (Kd) et du nombre de sites récepteurs aux LDL (N) sur les cellules HeLa (5 déterminations).

Pour chaque expérience, après deux heures d'incubation à 4°C, la fixation totale des ^{125}I -LDL a été mesurée pour différentes concentrations. La représentation de Scatchard a permis de calculer le Kd et N.

La variabilité sur le Kd et N peut venir :

- des cellules,
- du ligand.

Selon la croissance cellulaire, l'expression du récepteur LDL à la surface cellulaire est variable. Dans la phase logarithmique de croissance, la cellule a un besoin important de cholestérol pour la synthèse des membranes.

La préparation des lipoprotéines est très reproductible, leur qualité est régulièrement vérifiée par électrophorèse en gel LIPOFILM (Fiche technique n°4). Cependant, nous avons remarqué une variabilité d'un marquage à un autre, peut-être due à de l'Iode libre résiduel. En effet, la qualité de la fixation spécifique et des "blancs" sans cellules est améliorée si nous dialysons les ^{125}I -LDL contre du PBS 0,01 M - Na_2EDTA 0,01% après le passage sur colonne Sephadex G25 (de type PD10 Pharmacia).

Nous avons réalisé un nombre important d'expérimentations (14 expérimentations) en incubant les cellules HeLa avec une concentration fixe de ^{125}I -LDL (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Quand nous incubons les cellules HeLa pendant 2 heures à 4°C avec 10 μg ^{125}I -LDL/ml, nous obtenons $39,5 \pm 6,8$ ng de protéines fixées par mg de protéines cellulaires (19 déterminations).

Quand nous incubons les cellules HeLa pendant 4 heures à 37°C avec 10 μg ^{125}I -LDL/ml, nous obtenons :

- 280 ± 133 ng de protéines fixées et internalisées par mg de protéines cellulaires,
- 434 ± 182 ng de protéines dégradées par mg de protéines cellulaires.

Nous attribuons la variabilité des résultats (écarts types assez importants) au métabolisme plus ou moins important des cellules selon leur état de culture.

I.3. Conclusion

Les cellules HeLa fixent de façon spécifique et saturable les LDL. Elles représentent un bon modèle pour les études des interactions lipoprotéines-récepteurs. Elles peuvent représenter un témoin interne d'expérimentation pour la qualité du radioligand.

II. ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS LDL SUR FIBROBLASTES

Les fibroblastes sont mis en culture à partir d'une biopsie de peau. Dès 1975, les travaux de Goldstein et Brown sur des fibroblastes de peau en culture ont permis d'étudier la génétique de l'hypercholestérolémie familiale (Goldstein et al., 1975).

En effet, la mise au point d'une technique de radioligand a conduit à la découverte d'une déficience du récepteur LDL qui perturbe le métabolisme des lipoprotéines (Goldstein et Brown, 1974). Le cholestérol n'est pas épuré et s'accumule dans le sang.

Bien que la technique soit largement décrite, nous nous sommes attachés à standardiser ces méthodes dans notre laboratoire afin que les résultats obtenus soient totalement fiables.

II.1. Matériels et méthodes

II.1.1. Les sujets

Les fibroblastes sont mis en culture à partir d'une biopsie de peau réalisée sur les sujets suivants (Fiche technique n°8) :

a. Témoin normal positif (V et P)

Nous avons deux cultures de cellules normales provenant d'un sujet de sexe masculin et d'un sujet de sexe féminin, normolipémiques.

b. Témoin négatif (W)

Ce sujet est homozygote pour l'hypercholestérolémie familiale (FH). Agé de 20 ans, de sexe féminin, le sujet présente une cholestérolémie supérieure à 6 g/l. La triglycéridémie est normale. Il a été classé "récepteur négatif" par l'équipe de Goldstein et Brown qui ont trouvé moins de 5% de l'activité normale de fixation des LDL sur les fibroblastes.

Elle est actuellement traitée par plasmaphérèse itérative au Centre Hospitalier Régional de Lille.

c. Témoin hétérozygote pour l'hypercholestérolémie familiale (Z)

La mère du sujet précédent est hétérozygote pour l'hypercholestérolémie familiale. Elle a transmis le gène mutant à son enfant (le deuxième gène mutant est hérité du père). Son cholestérol plasmatique est supérieur à 4 g/l en absence de traitement.

II.1.2. La culture des cellules (Fiche technique n°8)

Les cellules sont cultivées en milieu DMEM contenant 10% v/v de SVF dans des flacons de 80 cm². Quand les cellules forment une culture confluente, elles sont trypsinées etensemencées sur une surface plus importante. Un puits de culture de 3,5 cm de diamètre estensemencé avec 60 000 à 80 000 cellules.

Le milieu est aspiré après 4 à 5 jours de culture puis les cellules sont incubées pendant 48 heures en milieu DMEM contenant 10% v/v de LPDS.

II.1.3. Les lipoprotéines

Les LDL sont préparées et marquées à l'Iode ¹²⁵I comme précédemment (I.1.1.).

II.1.4. Technique de dosage du récepteur LDL (Fiche technique n°11)

Après 48 heures d'incubation en milieu DMEM/LPDS, les cellules sont mises en présence de 0,7 ml de DMEM/LPDS contenant une concentration fixe (10 µg/ml) ou une gamme de concentrations croissantes de ¹²⁵I-LDL (1 à 25 µg/ml). Les cellules sont incubées pendant :

- 2 heures à 4°C
- ou 4 heures à 37°C.

La fixation spécifique des ^{125}I -LDL est calculée par différence entre la fixation totale et la fixation non spécifique en présence d'un excès de LDL non marquées.

Des boîtes témoins sans cellules recevant aussi les ^{125}I -LDL permettent d'évaluer la fixation non spécifique sur le plastique des boîtes et la dégradation spontanée des ^{125}I -LDL.

II.2. Résultats

Dans un premier temps, nous avons comparé les trois souches (normale, hétérozygote et homozygote FH) avec des cellules dont l'ensemencement n'était pas contrôlé (un flacon \rightarrow 18 à 24 puits) et nous n'avons effectué qu'une détermination avec $10 \mu\text{g } ^{125}\text{I}$ -LDL/ml.

Nous obtenons les résultats suivants pour la souche normale la plus étudiée (V) à concentration fixe de ^{125}I -LDL ($10 \mu\text{g/ml}$), sur 17 expérimentations :

- à 4°C , $15,35 \pm 4,49$ ng de protéines fixées par mg de protéines cellulaires.
- à 37°C , $154,05 \pm 48,81$ ng de protéines fixées et internalisées par mg de protéines cellulaires
 $339,90 \pm 127,45$ ng de protéines dégradées par mg de protéines cellulaires.

Ces résultats, obtenus sur une même souche, montrent que la méthode présente une bonne reproductibilité.

L'étude comparative des cellules hétérozygotes et homozygotes avec les cellules normales nous a posé un problème.

Les résultats obtenus sur 5 et 3 expérimentations sont respectivement les suivants :

- Pour la souche hétérozygote (Z), la fixation à 4°C varie de 9,05 à 15,5 ng de protéines fixées par mg de protéines cellulaires, soit en moyenne $72 \pm 21\%$ de l'activité des cellules normales.
- A 37°C , la fixation-internalisation varie de 80,1 à 153,4 ng de protéines par mg de protéines cellulaires, et la dégradation de 98,5 à 237,9 ng de protéines par mg de protéines cellulaires (soit

respectivement en moyenne $75 \pm 17\%$ et $54 \pm 27\%$ de l'activité des cellules normales).

- Pour la souche homozygote (W), la fixation à 4°C varie de 4,3 à 8,3 ng de protéines par mg de protéines cellulaires, soit en moyenne $42,3 \pm 11\%$ de l'activité des cellules normales.

A 37°C , la fixation-internalisation varie de 4,6 à 26 ng de protéines par mg de protéines cellulaires, et la dégradation de 37,4 à 142,7 ng de protéines par mg de protéines cellulaires (soit respectivement $10,3 \pm 5,7\%$ et $23 \pm 13,6\%$ de l'activité des cellules normales).

D'une expérimentation à une autre, la comparaison avec le témoin normal ne donne pas toujours les résultats escomptés.

En effet, l'activité moyenne des récepteurs LDL du sujet homozygote, tout en étant très faible pour certaines expériences, est supérieure en moyenne aux 5% évalués par l'équipe de Goldstein et Brown.

La fixation et l'internalisation des LDL par les cellules hétérozygotes ne sont diminuées en moyenne que de 25% par rapport aux valeurs normales.

Comme pour les cellules HeLa, une bonne reproductibilité est assurée dans un premier temps par un même lot de ^{125}I -LDL. L'activité spécifique ne doit pas être trop élevée (200 à 500 cpm/ng ^{125}I -LDL). Si elle l'était, il faudrait redialyser les échantillons afin d'éliminer l'Iode libre résiduel.

Pour parfaitement comparer l'activité des récepteurs LDL de deux souches différentes, nous avons donc réalisé une gamme complète de ^{125}I -LDL et essayé d'utiliser des cellules dans un même état de confluence.

Les cultures sont dans un même état de confluence en ensemençant les différentes souches avec un même nombre de cellules. La quantité de protéines cellulaires par puits est alors plus homogène d'une souche à l'autre car la densité cellulaire de départ est la même.

L'ensemencement pouvant varier de 50 000 à 80 000 cellules par puits de 3,5 cm de diamètre, deux souches pourront être comparées quand elles auront été expérimentées en même temps.

Nous pouvons noter (Figures 4A-4B) que quelle que soit la souche normale de référence (V ou P) la fixation et le métabolisme des LDL par les cellules du patient hétérozygote pour l'hypercholestérolémie familiale sont diminués de moitié.

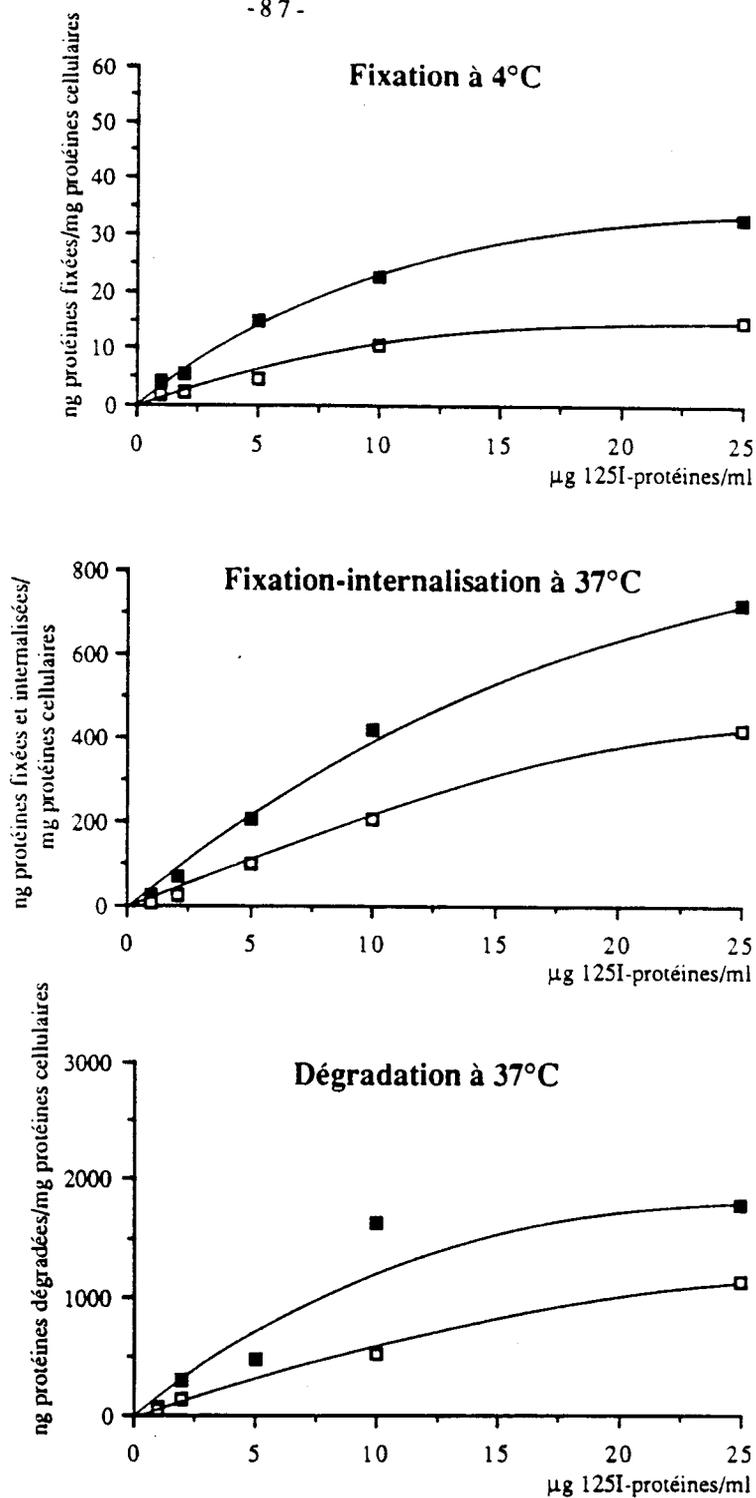


Figure 4A : Fixation à 4°C, fixation-internalisation et dégradation à 37°C des ^{125}I -LDL par les fibroblastes normaux (V.) et les fibroblastes du sujet hétérozygote FH (Z.).

- V., sujet normal
- Z., sujet hétérozygote FH

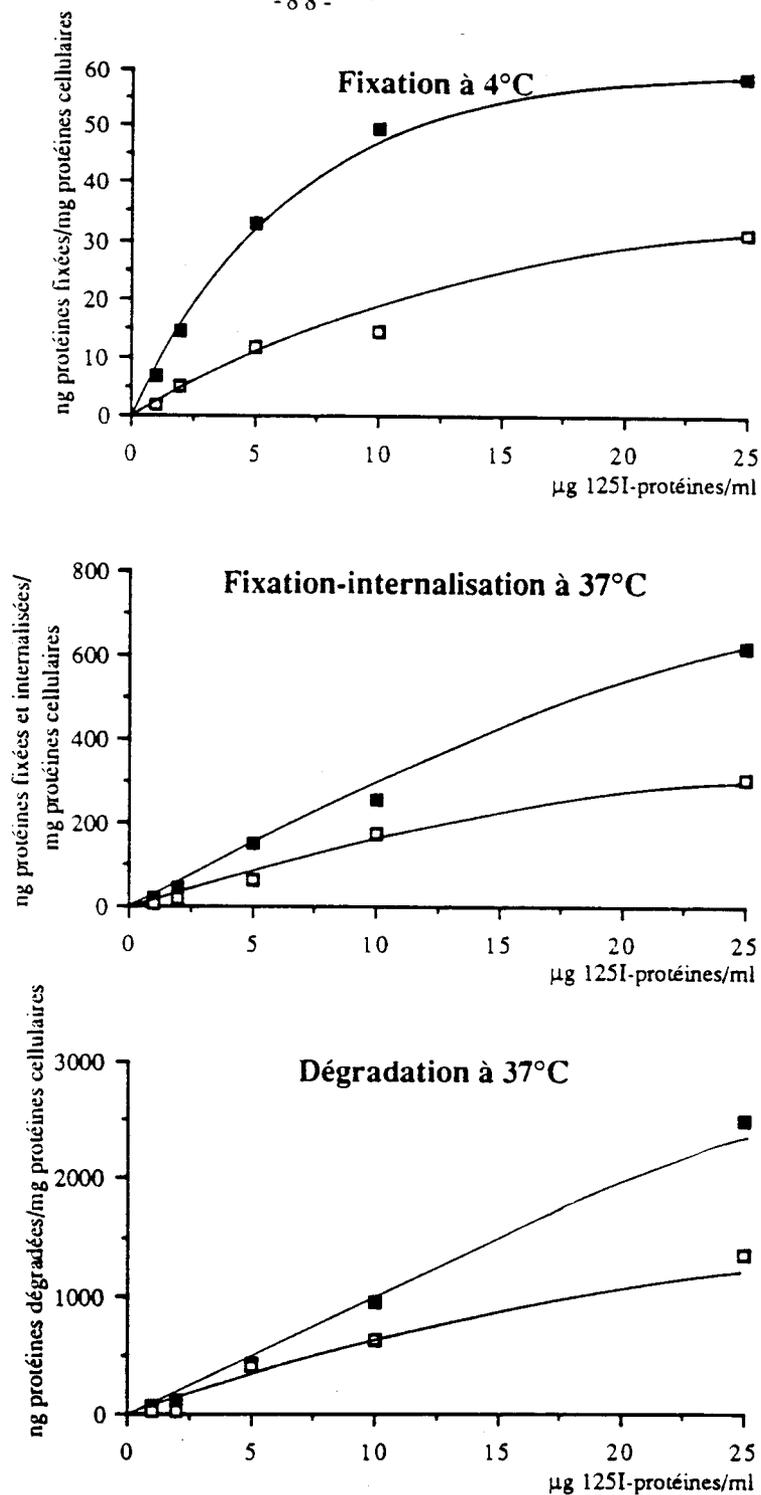


Figure 4B : Fixation à 4°C, fixation-internalisation et dégradation à 37°C des 125I-LDL par les fibroblastes normaux (P.) et les fibroblastes du sujet hétérozygote FH (Z.).

- P., sujet normal
- Z., sujet hétérozygote FH

L'activité des récepteurs LDL du sujet homozygote (Figure 5) est très diminuée par rapport au sujet hétérozygote et encore plus par rapport au sujet normal de référence.

Pour les expériences à 4°C, nous pouvons, par un graphe de Scatchard, mesurer l'affinité apparente K_d et le nombre de sites N de chaque souche (Tableau II).

La souche hétérozygote exprime moins de la moitié de récepteurs LDL (18 000 sites) que les souches normales (41 000 et 54 500 sites).

La souche homozygote exprime 5% environ des récepteurs LDL des souches normales.

Les valeurs de K_d ($K_d = 29$ nM environ) sont très proches d'une souche à une autre.

Les récepteurs LDL exprimés par la souche hétérozygote et homozygote ont donc la même affinité pour les LDL que ceux exprimés par les cellules normales.

II.3. Conclusion

Les fibroblastes sont obtenus à partir d'une biopsie de peau. Leur mise en culture, qui nécessite deux mois environ, permet d'étudier l'activité du récepteur LDL. La préincubation en milieu dépourvu en lipoprotéines donne une expression maximale du récepteur LDL.

Nous avons utilisé une technique de radioligand pour mesurer l'activité des récepteurs LDL de cellules provenant de quatre sujets. Quand ces souches sont à un même stade de confluence (ensemencement contrôlé), elles peuvent être comparées au cours d'une même expérimentation.

Les cellules d'un sujet homozygote (W) pour l'hypercholestérolémie familiale (2 allèles mutants) ont 5% des sites récepteurs d'une souche normale.

Sa mère (Z), hétérozygote pour cette maladie, a la moitié moins de récepteurs LDL actifs que les souches normales.

La technique de radioligand sur fibroblastes peut être utilisée pour apprécier l'activité des récepteurs LDL de différents sujets, la comparaison avec une souche normale devant se faire au cours d'une même

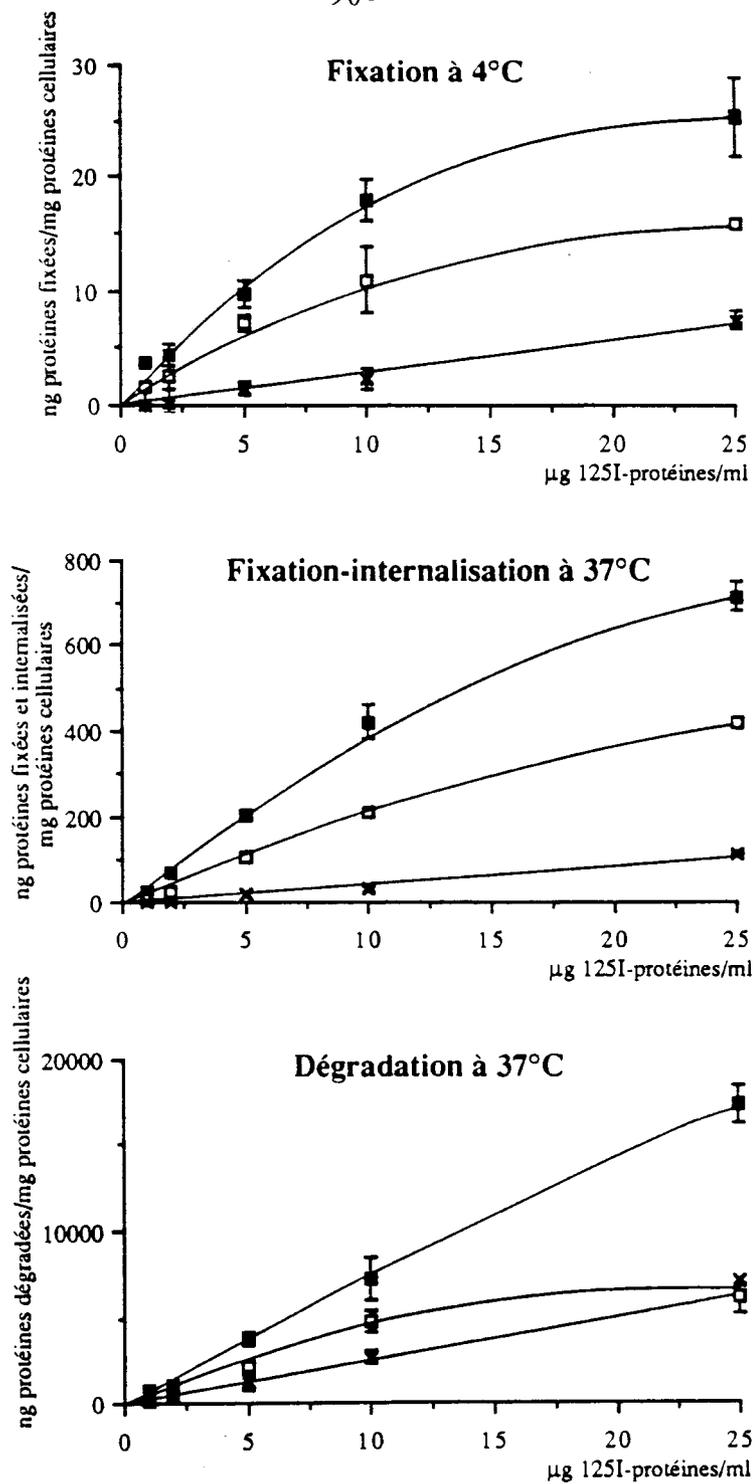


Figure 5 : Fixation à 4°C, fixation-internalisation et dégradation à 37°C des ^{125}I -LDL par les fibroblastes normaux (V.) et les fibroblastes du sujet hétérozygote FH (Z.) et du sujet homozygote FH (W.).

- V., sujet normal
- Z., sujet hétérozygote FH
- × W., sujet homozygote FH

	Kd n M	N
V	29,6 ± 5,05	41000 ± 11 000
P	22,6	54500
Z	29,5 ± 1,05	17773 ± 1 000
W	36,4	2500

Tableau II : Valeurs de la constante de dissociation (Kd) et du nombre de sites récepteurs aux LDL (N) pour chaque souche de fibroblastes.

Après une incubation de 2 heures à 4°C, la fixation totale des ^{125}I -LDL est mesurée pour chaque souche. La représentation de Scatchard a permis de calculer le Kd et N.

V. et P. sujets normaux.

Z. sujet hétérozygote FH.

W. sujet homozygote FH.

expérimentation, dans un même état de confluence, et avec une gamme de concentrations croissantes de ligands radiomarqués.

III. ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS LDL SUR LYMPHOCYTES

A l'origine, les défauts génétiques du récepteur LDL dans l'hypercholestérolémie familiale ont été étudiés sur les fibroblastes de patients souffrant de cette maladie (Brown et Goldstein, 1976). Puis l'activité des récepteurs LDL a été décrite sur lymphocytes (Ho et al., 1976b ; Bilheimer et al., 1978).

Dans notre laboratoire, un dosage de l'activité du récepteur LDL des lymphocytes par immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C utilisant les LDL ou un anticorps oligoclonal de lapin anti-récepteur LDL a été mis au point (Benhamamouch, 1988 ; Benhamamouch et al., 1988). L'anticorps anti-récepteur LDL nous semblait un réactif plus stable que les LDL.

L'utilisation de cette technique nous a permis de doser le récepteur LDL chez des patients souffrant d'hypercholestérolémie (cf chapitre III.) Nous avons aussi réalisé quelques expériences de détection de l'activité du récepteur LDL par des LDL fluorescentes car nous pensions que cela aurait pu simplifier les manipulations (une seule incubation au lieu de 2 ou 3 en immunofluorescence indirecte).

III.1. Matériels et méthodes

III.1.1. Les lipoprotéines

Les LDL (densité 1,030-1,053) et les HDL₃ (densité 1,120-1,210) sont isolées par ultracentrifugation séquentielle (Fiche technique n°1). Les LDL sont gardées filtrées stérilement.

Pour les expérimentations de fluorimétrie directe les LDL sont marquées par un composé fluorescent, le DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindocarbocyanine perchlorate) (Pitas et al., 1981 ; Fiche technique n°6).

Les LDL diluées dans le LPDS sont incubées avec le DiI. Le DiI s'incorpore dans l'enveloppe externe de la LDL avec une orientation similaire à celle des phospholipides.

Quand les DiI-LDL sont internalisées par la cellule et dégradées dans les lysosomes, le DiI s'incorpore et s'accumule dans les membranes lysosomales (Barak et Webb, 1981).

III.1.2. Les immunoglobulines

a. Les immunoglobulines anti-LDL

Une fraction de LDL humaines, dans une zone de densité étroite 1,040-1,053, ne contenant dans sa partie protéique que l'apoB, est utilisée comme antigène pour l'obtention d'immunsérum chez le lapin.

Les immunoglobulines anti-LDL sont précipitées à partir du sérum avec du sulfate de sodium à 180 g/l (Fievet et al., 1984).

b. L'anticorps anti-récepteur LDL

Un peptide de synthèse de 12 acides aminés, reproduisant la séquence amino-terminale du récepteur LDL a été synthétisé, couplé à l'anatoxine tétanique puis injecté à des lapins (Agnani et al., 1989). Ces lapins immunisés produisent des immunoglobulines dont la purification se fait par chromatographie d'affinité sur colonne AH-Sepharose 4B (Pharmacia) sur laquelle le peptide a été fixé.

III.1.3. Les lymphocytes

a. Isolement des lymphocytes

Les cellules lymphocytaires sont isolés du sang prélevé sur citrate, selon la méthode de Boyüm, 1968 (Fiche technique n°10).

b. Stimulation de l'expression des récepteurs LDL

Les lymphocytes sont isolés 48 à 72 heures avant le test et préincubés en milieu RPMI contenant 1% p/v de SAB et 300 µg HDL3/ml pour promouvoir l'efflux de cholestérol et stimuler l'expression cellulaire des récepteurs LDL (Oram et al., 1981 ; Aviram et al., 1989).

III.1.4. L'immunofluorescence indirecte

L'activité des récepteurs LDL des lymphocytes est étudiée à 4°C en révélant la fixation des LDL ou de l'anticorps anti-récepteur par des immunoglobulines de chèvre anti-immunoglobulines de lapin marquées à la fluorescéine : FITC-Ig (Fiche technique n°12).

a. Fixation des LDL

Les lymphocytes sont incubés pendant 45 minutes à 4°C avec des LDL à 25 µg/ml.

Après lavage, une deuxième incubation avec les immunoglobulines anti-LDL à 50 µg/ml est réalisée. Le complexe "LDL-anti LDL" est révélé par une troisième incubation avec le FITC-Ig dilué au 1/20 v/v.

Après lavage, le culot cellulaire est repris par du paraformaldéhyde à 1% dans le PBS 0,01 M et analysé en cytofluorimétrie.

b. Fixation de l'anti-récepteur LDL

Les lymphocytes ne reçoivent en première incubation que du tampon C (PBS 0,01 M - CaCl₂ 0,5 mM - SAB 2%). Puis, ils sont incubés pendant 45 minutes à 4°C avec l'anticorps anti-récepteur LDL purifié à 5 µg/ml. Les lavages et l'incubation avec le FITC-Ig sont réalisés comme décrit précédemment.

Des témoins de fluorescence non spécifique du FITC-Ig (To) sont obtenus par incubation des lymphocytes aux deux premières étapes avec du tampon C, puis avec le FITC-Ig au 1/20 v/v en dernière étape.

c. Cytofluorimétrie

Les suspensions cellulaires sont analysées par un orthocytofluorographe 50H (Orthodiagnostic System) équipé de deux LASER.

Le LASER ion-argon excite la fluorescéine à 488 nm. L'émission de fluorescence est mesurée entre 520 et 540 nm.

Le second LASER hélium-néon permet d'estimer la taille des cellules en fonction de l'extinction de la lumière et ainsi de définir une population homogène en taille. Les cellules mortes et les débris, captant de manière non spécifique les ligands, sont exclus de cette fenêtre.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dont l'intensité de fluorescence est supérieure au seuil de détection déterminé pour l'appareil.

III.1.5. La fluorescence directe

L'activité des récepteurs LDL des lymphocytes est étudiée à 4°C ou à 37°C avec des LDL fluorescentes (DiI-LDL).

Les lymphocytes sont incubés avec des DiI-LDL à 25 µg/ml pendant :

- 2 heures à 4°C pour étudier la fixation,
- 5 heures à 37°C pour étudier la fixation-internalisation.

Un témoin d'autofluorescence est obtenu en incubant les lymphocytes avec le tampon C.

La fixation à 4°C et la fixation-internalisation à 37°C non spécifiques sont évaluées par incubation des lymphocytes avec les DiI-LDL et un excès de LDL non marquées (1 mg/ml).

Le DiI est excité à 488 nm.

L'utilisation d'un filtre permet d'observer la fluorescence émise, aux longueurs d'onde supérieures à 575 nm.

III.2. L'immunofluorescence indirecte

III.2.1. Résultats

La technique d'immunofluorescence indirecte mise au point dans notre laboratoire (Benhamamouch et al., 1988) présente les caractéristiques suivantes :

- La fluorescence non spécifique du FITC-Ig (To) varie de 6 à 10%. C'est-à-dire que, dans ce système, 6 à 10% des cellules sont fluorescentes.

- La fixation non spécifique de l'anti-LDL (lymphocytes + anti-LDL + FITC-Ig) est de l'ordre de 8%.

Cependant ces résultats varient d'un lot d'anti-LDL à un autre. En effet, il arrive parfois que la préparation de ces immunoglobulines donnent une fixation non spécifique très élevée. A chaque changement de lot d'anticorps anti-LDL, il faut donc s'assurer d'une faible fixation non spécifique sur les cellules.

- La stimulation maximale et reproductible des récepteurs LDL est obtenue en incubant les lymphocytes en RPMI/SAB additionné de 300 µg HDL₃/ml.

L'efflux de cholestérol cellulaire est induit par la présence des HDL₃. 72 heures d'incubation à 37°C sont nécessaires pour obtenir un maximum de cellules fixant les LDL ou l'anticorps anti-récepteur LDL.

- Les conditions de standardisation sont les suivantes :

- incubation de 2.10^6 lymphocytes
- + LDL 25 µg/ml
- + anti-LDL 50 µg/ml
- + FITC-Ig 1/20 1/20
- ou incubation de 2.10^6 lymphocytes
- + anti-récepteur LDL purifié 5 µg/ml
- + FITC-Ig 1/20 v/v

- Le pourcentage de lymphocytes fluorescents chez les sujets normaux (50 déterminations) est de :

- 59% ± 5% avec le système LDL,
- 39% ± 2% avec le système anti-récepteur.

- La technique a été validée chez deux sujets homozygotes pour l'hypercholestérolémie familiale et leurs parents, hétérozygotes FH confirmés. La figure 6 présente les résultats obtenus sur les lymphocytes d'un sujet normal (A), hétérozygote FH (B), et homozygote FH (C) sous forme d'histogramme de fluorescence. En abscisse se trouve l'intensité de fluorescence (échelle logarithmique, unités arbitraires) et en ordonnée le nombre de cellules.

Les valeurs trouvées pour les patients homozygotes correspondent à un pourcentage de fluorescence non spécifique, quelque soit le système (LDL ou anti-récepteur). Ces résultats confirment ceux obtenus sur leurs fibroblastes. Ces cellules ne produisent pas de récepteurs LDL fonctionnels à leur surface.

Des valeurs intermédiaires entre homozygotes FH et normaux sont obtenues avec les lymphocytes de sujets hétérozygotes FH confirmés.

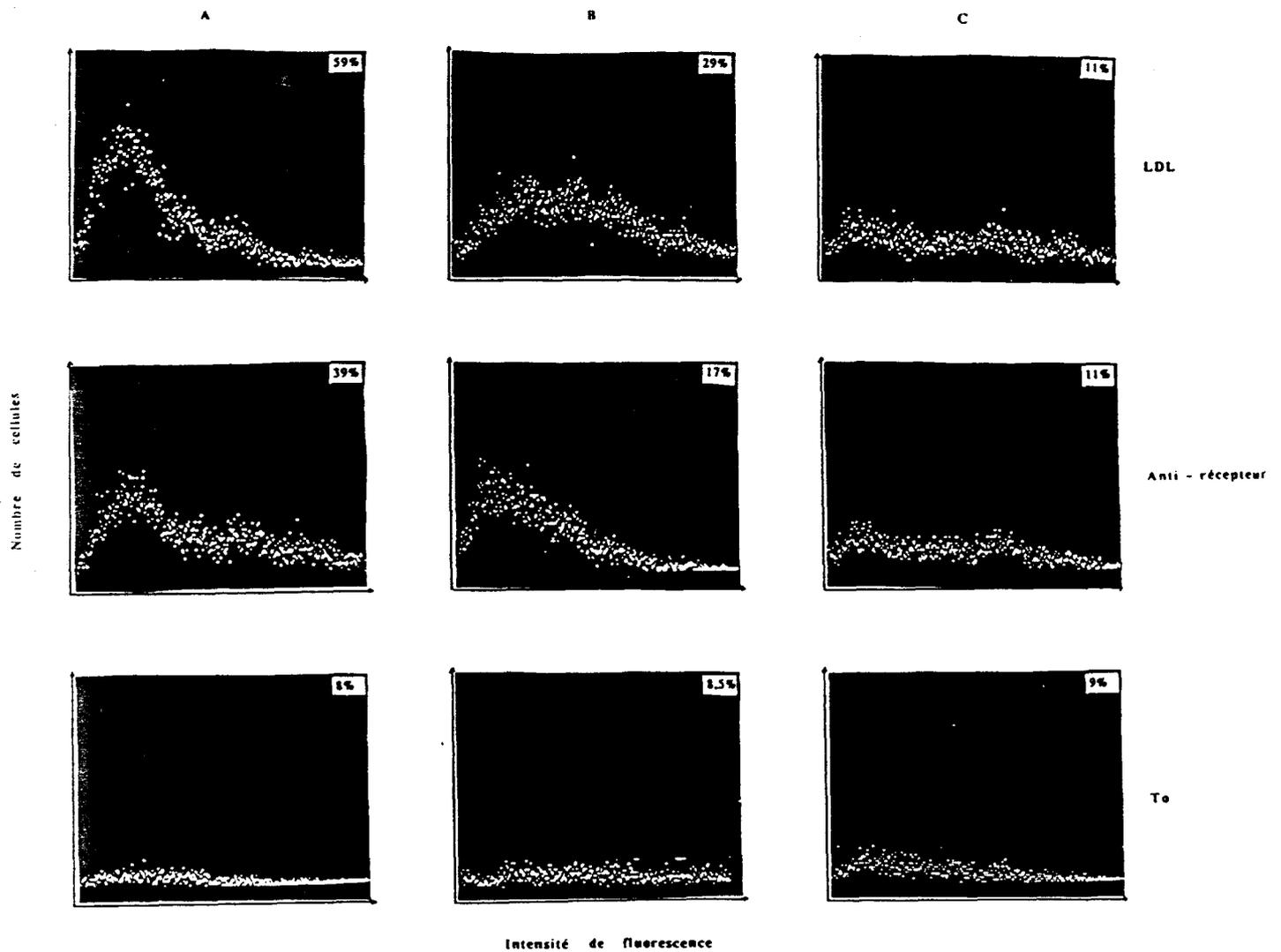


Figure 6 : Distribution de la fluorescence des lymphocytes normaux (A), hétérozygotes FH (B) et homozygotes FH (C) après immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C. Les résultats sont donnés en pourcentage de cellules dont la fluorescence est supérieure au seuil d'intensité.

En abscisse : intensité de fluorescence, échelle logarithmique, unités arbitraires.

En ordonnée : nombre de cellules.

- Une bonne corrélation a été trouvée entre les tests de fixation des LDL et ceux de fixation des immunoglobulines anti-récepteurs LDL sur les lymphocytes de l'ensemble des sujets étudiés.



III.2.2. Discussion

La fixation non spécifique du FITC-Ig et des immunoglobulines anti-LDL est due principalement à la présence à la surface des lymphocytes de récepteurs spécifiques pour les fragments Fc des anticorps.

Cependant, certains lots d'anti-LDL ont une fixation non spécifique importante sur les lymphocytes (bien que le To ait des valeurs tout à fait acceptables de 10% environ).

Leur reconnaissance spécifique vis-à-vis de l'apoB a pourtant été prouvée. Les causes de la fixation non spécifique élevée de certains lots ne sont pas élucidées.

Une excellente corrélation étant montrée entre les deux tests (LDL et anti-récepteur LDL), nous avons réalisé l'application clinique de cette technique essentiellement avec le système "lymphocytes + LDL + anti-LDL + FITC-Ig". En effet, l'anticorps anti-récepteur LDL ayant une plus faible affinité que les LDL, le signal de fluorescence est plus important avec le système "LDL-anti LDL-FITCIg" et les résultats semblent plus sensibles.

L'utilisation de cette technique nous a permis de confirmer chez certains patients hypercholestérolémiques le déficit en récepteurs LDL. Par contre chez d'autres le déficit n'a pu être diagnostiqué. Ces différentes études font l'objet de notre troisième chapitre.

III.3. La fluorescence directe

III.3.1. Résultats

Le métabolisme des DiI-LDL à 37°C analysé par cytométrie de flux a permis l'étude de l'activité du récepteur LDL des lymphocytes d'un sujet normal (P) et d'un sujet homozygote pour l'hypercholestérolémie familiale (W). Ces deux sujets ont été largement utilisés dans les études d'activité du récepteur LDL au niveau des fibroblastes (Chapitre II II.).

Les résultats sont présentés dans la figure 7 et le tableau III.

La figure 7 expose les résultats sous forme d'histogramme de fluorescence après incubation à 37°C pendant 5 heures avec des DiI-LDL ou avec les DiI-LDL et un excès de LDL non fluorescentes (fixation-intériorisation non spécifique). En abscisse sont données les intensités de fluorescence (échelle logarithmique, unités arbitraires), et en ordonnée le nombre de cellules.

A 4°C, pour les deux souches, aucune fixation des DiI-LDL n'est détectable. La fluorescence reste au même canal d'intensité que l'autofluorescence soit :

- 204 pour P,
- 210 pour W.

A 37°C avec les DiI-LDL, la fluorescence des cellules est décalée vers la droite (donc vers les plus fortes intensités) dans des proportions différentes pour les deux souches. Pour les lymphocytes normaux (P), le maximum de cellules fluorescentes atteint le canal 242. Par contre pour les lymphocytes du sujet homozygote FH, le pic de fluorescence couvre le pic d'autofluorescence, et un déplacement minime de 10 canaux est observé. Pour les deux souches, l'excès de LDL non marquées ramène la fluorescence à la valeur d'autofluorescence montrant que nous analysons bien la fixation des LDL à un récepteur spécifique, le récepteur LDL.

Nous pouvons aussi exprimer les résultats sous la forme de pourcentage de cellules analysées dont la fluorescence est supérieure au seuil d'intensité déterminé pour l'appareil. Ces résultats sont représentés dans le tableau III.

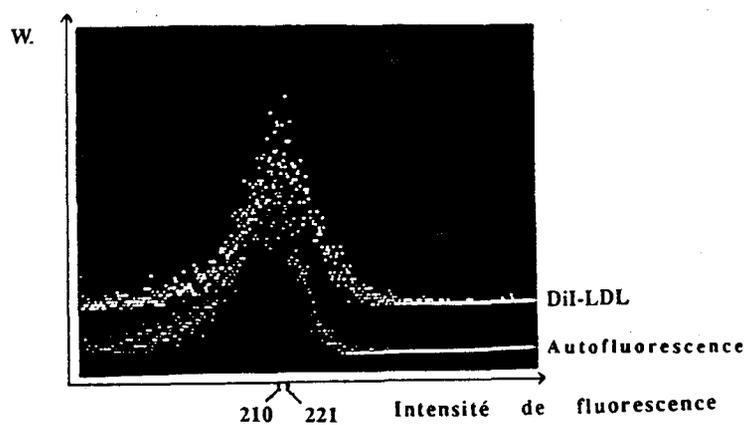
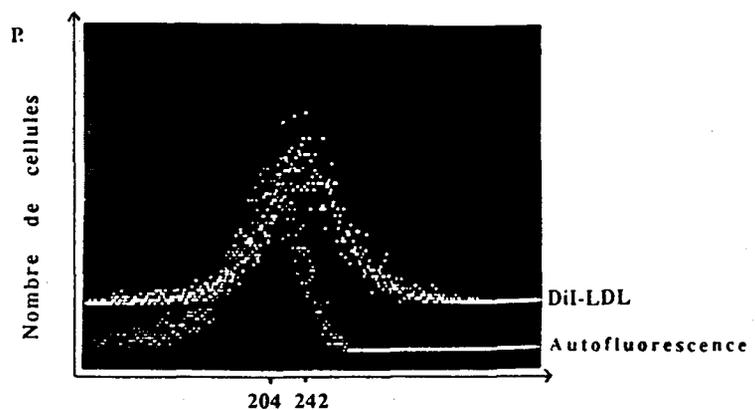


Figure 7 : Distribution de la fluorescence des lymphocytes d'un sujet normal (P.) et d'un sujet homozygote FH (W.) après incubation pendant 5 heures à 37°C avec 25 μ g DiI-LDL/ml.

Un témoin d'autofluorescence est réalisé en incubant les lymphocytes dans le tampon sans lipoprotéines fluorescentes.

En abscisse : intensité de fluorescence, échelle logarithmique, unités arbitraires.

En ordonnée : nombre de cellules.

Cytométrie de flux		lymphocytes	
		P.	W.
2 heures 4°C	autofluorescence	4%	4%
	DiI-LDL	4%	4%
	DiI-LDL + excès LDL	4%	4%
5 heures 37°C	autofluorescence	5%	5%
	DiI-LDL	42%	17%
	DiI-LDL + excès LDL	4%	5%

Tableau III : Cytofluorimétrie de flux sur lymphocytes de sujet normal (P.) et de sujet homozygote FH (W.).

Les lymphocytes sont incubés pendant 2 heures à 4°C ou pendant 5 heures à 37°C en présence de LDL fluorescentes (DiI-LDL).

Un témoin d'autofluorescence est réalisé par incubation des cellules dans le tampon sans lipoprotéines fluorescentes.

La fixation-internalisation non spécifique est estimée en incubant les cellules avec les DiI-LDL et un excès de LDL non marquées.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dont la fluorescence est supérieure au seuil d'intensité.

A 4°C, l'incubation avec les LDL fluorescentes ne semble pas modifier la fluorescence des cellules (même pourcentage de cellules fluorescentes qu'après une simple incubation en tampon C).

A 37°C, 42% des cellules du sujet normal sont fluorescentes après incubation avec les DiI-LDL. Ce même traitement conduit à seulement 17% de cellules fluorescentes pour le sujet homozygote FH.

III.3.2. Discussion

L'utilisation de cette technique de cytométrie de flux avec les DiI-LDL comme ligand fluorescent, nous a permis d'étudier l'expression du récepteur LDL au niveau des lymphocytes d'un sujet normal et d'un sujet homozygote FH.

Les résultats présentés, exprimés de deux façons différentes, sont tout à fait en accord avec les résultats obtenus sur les fibroblastes de ces deux sujets.

A 4°C, ce système ne semble pas assez sensible. Aucune fluorescence n'est détectable à la surface des cellules.

Par contre, à 37°C, les cellules captent les DiI-LDL. Alors que les LDL sont dégradées, le DiI s'accumule dans les membranes lysosomales. Il n'est relargué que plusieurs jours plus tard.

A 37°C, nous observons donc la fixation-internalisation des LDL par les lymphocytes. Cette activité est déficiente pour les lymphocytes de W. par rapport aux lymphocytes de P. Cependant la différence entre les deux souches, normale et homozygote, ne semble pas suffisante pour permettre le diagnostic d'hypercholestérolémie familiale de type hétérozygote.

III.4. Conclusion

L'immunocytofluorimétrie indirecte a été validée chez des sujets normaux et des sujets souffrant des deux formes de l'hypercholestérolémie familiale : hétérozygote et homozygote. Dans ce système, les cellules provenant de sujets hétérozygotes FH présentent un pourcentage de cellules

fluorescentes intermédiaire entre normaux et homozygotes FH. Cette technique nous a permis de confirmer chez certains patients hypercholestérolémiques le déficit en récepteurs LDL.

La cytométrie de flux utilisant les DiI-LDL comme ligand fluorescent a permis de détecter la déficience de l'activité des récepteurs LDL des lymphocytes d'un sujet homozygote FH par rapport à un sujet normal. Cependant la différence observée ne parait pas suffisante pour le diagnostic ultérieur de l'hypercholestérolémie familiale de type hétérozygote.

Dans les différentes applications cliniques, l'activité des récepteurs LDL des lymphocytes a donc été évaluée par immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C avec le système "LDL + anti-LDL + FITC-Ig".

IV. ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS LDL SUR LYMPHOCYTES TRANSFORMES PAR LE VIRUS EPSTEIN-BARR

Une collaboration avec le Dr. Steve Humphries (Charing Cross Sunley Research Centre, Londres) nous a permis d'appliquer les techniques précédemment décrites (radioligand, immunocytofluorimétrie et cytométrie de flux) à des lymphocytes transformés par le virus Epstein-Barr.

Dans un premier temps, nous avons validé les techniques sur une lignée normale et une lignée hétérozygote pour l'hypercholestérolémie familiale. Ces souches cellulaires rendues immortelles nous ont permis de réaliser de nombreuses expérimentations et de mettre au point la technique de cytométrie de flux avec les LDL fluorescentes comme ligand. En effet, ces lymphoblastes ont un métabolisme important du fait de leur constante division. Le signal de fluorescence à 37°C devrait donc être plus important qu'avec les lymphocytes fraîchement isolés et devrait permettre de différencier les souches de cellules dont l'expression du récepteur LDL est normale ou déficiente.

IV.1. Matériels et méthodes

IV.1.1. L'isolement des lymphocytes

Les lymphocytes sont isolés (Fiche technique n°10 ; Boyüm, 1968), dans des conditions stériles, à partir du sang des sujets suivants :

- deux donneurs normolipidémiques (EBV 82 ET M. F.),
- un patient hétérozygote pour l'hypercholestérolémie familiale (Iceland 4A). Le gène mutant du récepteur LDL présente une délétion dans les exons 9 et 10.

IV.1.2. La transformation des lymphocytes par le virus Epstein-Barr (Neitzel, 1986)

Le virus Epstein-Barr est produit par une lignée cellulaire de singe. Les cellules sont congelées et décongelées plusieurs fois. La lyse

des cellules libère le virus dans le milieu de culture. La suspension de virus est conservé à -80°C par aliquots de 5 ml.

Après centrifugation de $10 \cdot 10^6$ lymphocytes, le culot est repris par 1 ml de suspension de virus.

Après incubation pendant 1 heure 30 à 37°C , les cellules infectées (lymphoblastes) sont centrifugées et resuspendues dans 10 ml de milieu RPMI contenant 10% v/v de SVF.

10 μl de cyclosporine A (1 mg/ml dans l'éthanol) vont tuer les lymphocytes T.

Chaque semaine, pendant 4 semaines, 5 ml de milieu sont remplacés par du milieu neuf et 10 μl de cyclosporine A sont ajoutés.

Après deux semaines, nous pouvons déjà observer les cellules qui commencent à se diviser et à former des "colonies".

Ces deux premières étapes (isolement et transformation des lymphocytes) ont été réalisées dans le laboratoire du Dr Humphries à LONDRES.

A ce stade, les cellules nous sont envoyées :

- en milieu de culture, à température ambiante,
- ou congelées, dans un colis de carboglace.

Dans l'un ou l'autre des cas, les cellules peuvent être remises immédiatement en culture.

IV.1.3. La culture des lignées lymphocytaires transformées

Les lignées lymphocytaires transformées sont cultivées en milieu RPMI contenant 10% v/v de SVF.

Les cellules formant des colonies en suspension ont tendance à se concentrer sur le fond du flacon de culture.

Deux fois par semaine, le surnageant de culture est remplacé par du milieu neuf.

Quand la densité cellulaire devient trop importante (milieu de culture virant au jaune en 24 heures), la culture est divisée et réensemencée dans plusieurs flacons.

Le contrôle des cultures est assez difficile à réaliser. Il semble en tout cas que plus nous entretenons la culture, moins la cellule se divise et plus la durée de la mitose est longue.

Quelques jours après la décongélation, les cellules sont de petite taille, elles se divisent rapidement en formant de petites colonies.

Par contre après plusieurs semaines, les cellules ont tendance à être plus grosses, moins de cellules se divisent et elles forment des colonies de grande taille.

Le contrôle de la culture cellulaire sera un de nos problèmes majeurs lors de l'interprétation des résultats.

24 heures avant l'étude de l'activité des récepteurs LDL, les cellules sont lavées une fois en RPMI puis remises en suspension ($5 \cdot 10^6$ cellules/4 ml) dans le milieu RPMI contenant 1% p/v de SAB. Les cellules sont alors incubées pendant 24 heures à 37°C dans un puits de boîte à 12 cupules ($5 \cdot 10^6$ cellules/puits).

IV.1.4. Les lipoprotéines

Les LDL ($1,030 < d < 1,053$) sont isolées par ultracentrifugation séquentielle (Havel et al., 1955 ; Fiche technique n°1).

Les lipoprotéines sont marquées à l'Iode ^{125}I (^{125}I -LDL) (Fiche technique n°5 ; Bilheimer et al., 1972) ou au DiI (DiI-LDL)(Fiche technique n°6 ; Pitas et al., 1981).

IV.1.5. Techniques de dosage du récepteur LDL

Nous avons mis au point les techniques de dosage de l'activité du récepteur LDL dans des boîtes à 96 cupules. L'utilisation des microfuges précédemment décrite (Ho et al., 1976b ; Traill et al., 1987 ; Benhamamouch et al., 1988) entraînait trop de manipulations. En particulier l'utilisation des boîtes à 96 cupules lors de la technique de radioligand nous a permis de réaliser simultanément un grand nombre de points, et donc de pouvoir comparer dans une même manipulation plusieurs lignées cellulaires.

Nous avons donc utilisé trois approches :

- étude de la fixation à 4°C, la fixation-internalisation et la dégradation à 37°C des ^{125}I -LDL,
- étude de la fixation à 4°C des LDL par immunocytofluorimétrie indirecte,
- étude de la fixation-internalisation à 37°C des LDL fluorescentes (DiI-LDL) par cytométrie de flux.

IV.2. Etude de la fixation à 4°C, de la fixation-internalisation et de la dégradation à 37°C des ^{125}I -LDL

IV.2.1. Méthodes

Pour ce type cellulaire en suspension, les détails techniques de la méthode de radioligand sont un peu différents de ceux décrits lors de l'utilisation de fibroblastes (Goldstein et Brown, 1974 ; Fiche technique n°11).

10^6 lymphoblastes sont incubés avec une concentration fixe (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou des concentrations croissantes (2, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de ^{125}I -LDL dans un volume final de 250 μl de RPMI/BSA pendant :

- 2 heures à 4°C pour étudier la fixation,
- 4 heures à 37°C pour étudier le métabolisme des ^{125}I -LDL.

Chaque point est réalisé en triple.

Ces incubations sont réalisées dans des boîtes à 96 cupules préalablement saturées pendant 24 heures à 37°C avec du milieu RPMI/SAB.

La fixation, la fixation-internalisation et la dégradation non spécifiques sont mesurées en présence de ^{125}I -LDL et de LDL non marquées en excès (20 fois la concentration des ^{125}I -LDL). Chaque point est réalisé en double.

La fixation, fixation-internalisation et la dégradation non spécifiques sont déduites des activités totales, pour donner la fixation, la fixation-internalisation et la dégradation spécifiques.

Des puits sans cellules sont incubés dans les mêmes conditions pour déterminer la radioactivité fixée non spécifiquement par le plastique des boîtes et les LDL dégradées spontanément.

a. Fixation à 4°C

Après une incubation de 2 heures à 4°C, la plaque est centrifugée à 1500 t/mn pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé. Les culots cellulaires sont lavés deux fois par 250 µl de tampon C (PBS 0,01 M + CaCl₂ 0,5 mM + SAB 2% p/v).

Les cellules sont ensuite reprises par 250 µl de PBS 0,01 M puis transférées dans des tubes à hémolyse. Après centrifugation à 4000 t/mn pendant 10 minutes, les surnageants sont éliminés et les protéines sont dissoutes dans 250 µl de NaOH 0,1 N. La radioactivité associée à chaque culot cellulaire est mesurée. Après 24 heures à 4°C, un aliquot de 100 µl est prélevé pour déterminer la concentration en protéines cellulaires de chaque point par la méthode de Petersen (Petersen, 1977 ; Fiche technique n°2).

Les résultats sont exprimés en ng de protéines fixées par mg de protéines cellulaires.

b. Fixation-internalisation à 37°C

Après incubation 4 heures à 37°C, la plaque est centrifugée à 1500 t/mn pendant 5 minutes. Le surnageant est prélevé pour déterminer la dégradation. Les culots cellulaires sont lavés et traités comme décrit précédemment pour la fixation à 4°C.

Les résultats sont exprimés en ng de protéines fixées et internalisées par mg de protéines cellulaires.

c. Dégradation à 37°C

A 200 µl de surnageant d'incubation (4 heures à 37°C) sont ajoutés 500 µl de RPMI/SAB et 175 µl d'acide trichloracétique (TCA) 50% p/v. Après une heure à 4°C, les protéines sont précipitées au TCA. Les tubes sont centrifugés à 2000 t/mn pendant 10 minutes. 375 µl de surnageant (contenant le matériel non précipitable au TCA, c'est-à-dire les protéines dégradées) sont prélevés dans des tubes en verre et additionnés de 10 µl d'Iodure de Potassium (IK) à 40% p/v et de 10 µl de H₂O₂ à 30% v/v. Après 5 minutes à température ambiante, 0,7 ml de chloroforme sont ajoutés. L'iode libre radioactif est ainsi éliminé par oxydation et extraction chloroformique. Après centrifugation à 2000 t/mn pendant 5 minutes, la radioactivité est comptée sur 0,175 ml de surnageant aqueux.

Les résultats sont exprimés en ng de protéines dégradées par mg de protéines cellulaires.

IV.2.2. Résultats

Les premières expérimentations sont réalisées avec une concentration fixe en ^{125}I -LDL (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mais avec des concentrations variables en protéines cellulaires (0,5 à 1.10^6 cellules) (Tableau IV).

Nous pouvons donc remarquer que les résultats dépendent de la concentration en protéines cellulaires. Lorsque la concentration en protéines cellulaires est importante, l'activité du récepteur LDL est généralement plus faible.

Leren et al. (1986) ont observé que l'activité des récepteurs LDL des cellules mononucléaires sanguines dépendait de la densité cellulaire. Quand la concentration cellulaire augmente, l'activité du récepteur LDL diminue. Ils suggèrent en fait que les LDL sont modifiées en présence des cellules. Elles se fixent alors avec moins d'affinité sur leur récepteur cellulaire.

Nous suggérons que la densité cellulaire influe directement sur l'activité du récepteur LDL. Quand la densité cellulaire est faible, les cellules ont tendance à se diviser. Leurs besoins en cholestérol pour la construction de leurs membranes sont importants et l'expression des récepteurs LDL est alors maximale. Par contre, quand la densité cellulaire est importante, les cellules ont plutôt tendance à ne plus se diviser et le nombre de récepteurs exprimés diminue.

Nous avons donc choisi de faire chaque fois le point avec 1.10^6 cellules (soit environ 0,120 mg de protéines cellulaires par puits) pour que le dosage de protéines soit le plus sensible possible (il faut que la concentration protéique soit assez importante pour que l'absorbance correspondante soit dans la zone linéaire de la courbe étalon).

La figure 8 donne la courbe de fixation à 4°C , de fixation-intériorisation et de dégradation à 37°C d'une gamme de ^{125}I -LDL par les lignées de lymphoblastes normaux et la lignée Iceland 4A.

A.

lignée	Protéines cellulaires m g	Fixation 4°C ng prot./mg prot. cell.
M. F.	0,026	28,3 ± 0,1
	0,0282	18,4 ± 0,7
	0,111	14,6 ± 2,7
Iceland 4A	0,0285	14,7 ± 2,9
	0,026	17,9 ± 4,3
	0,021	13,5 ± 4,6

B.

lignée	Protéines cellulaires m g	ng protéines par mg protéines cellulaires	
		Fixation-internalisation 37°C	Dégradation 37°C
M. F.	0,052	278,7 ± 41,7	263,6 ± 49,2
	0,092	239,1 ± 5,8	241,4 ± 24,8
	0,124	167,1 ± 11,7	175,8 ± 33,9
Iceland 4A	0,038	97,2 ± 7,5	235,4 ± 21,6
	0,056	66,0 ± 6,1	153,1 ± 48,8
	0,064	77,9 ± 14,9	195,3 ± 26,1

Tableau IV : Activité du récepteur LDL des lignées lymphocytaires transformées normale (M. F.) et hétérozygote FH (Iceland 4A) en fonction de la quantité en protéines cellulaires de l'essai.

A : Fixation à 4°C.

B : Fixation-internalisation et dégradation à 37°C.

Après incubation pendant 2 heures à 4°C ou 4 heures à 37°C en présence de 25 µg ¹²⁵I-LDL/ml, la radioactivité associée à chaque culot cellulaire est mesurée. La dégradation des ¹²⁵I-LDL est évaluée sur les surnageants d'incubation à 37°C.

Les protéines cellulaires sont mesurées selon la méthode de Petersen.

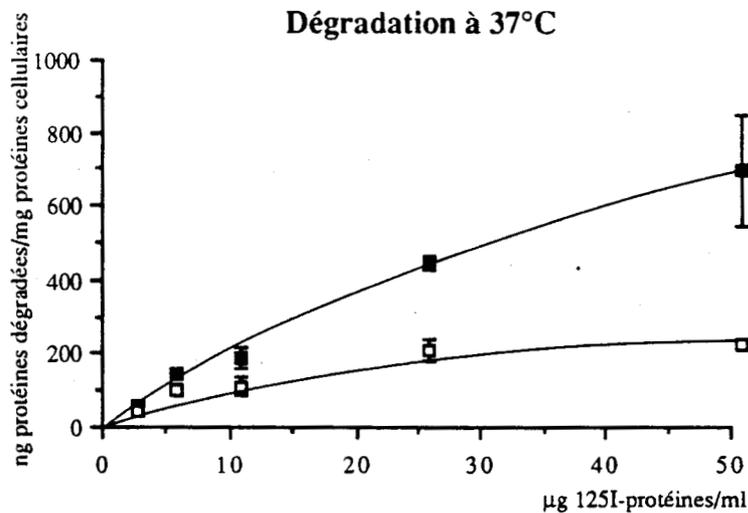
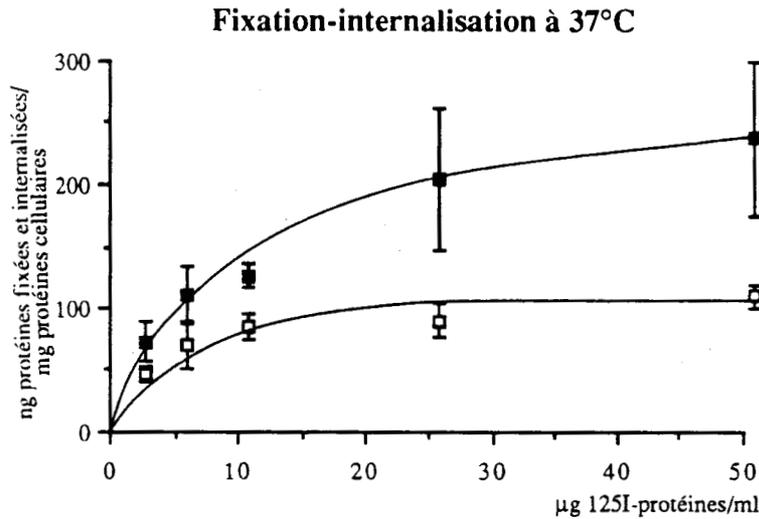
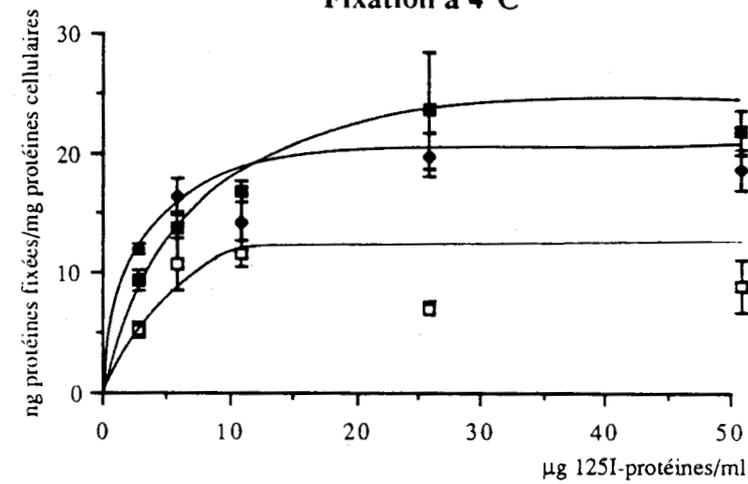


Figure 8 : Etude de la fixation à 4°C, de la fixation-internalisation et de la dégradation à 37°C d'une gamme de concentrations croissantes de ¹²⁵I-LDL par les lignées lymphoblastiques.

- M. F., lymphoblastes normaux
- EBV 82, lymphoblastes normaux
- Iceland 4A, lymphoblastes hétérozygotes FH

A 4°C, les lignées normales EBV 82 et M. F. présentent des courbes superposables. L'activité des récepteurs LDL de la lignée Iceland 4A est diminuée de moitié par rapport aux témoins.

Par la méthode de Scatchard, nous pouvons calculer le Kd et N pour chaque lignée :

M. F.	Kd = 6,0 nM
	N = 12675
EBV 82	Kd = 3,4 nM
	N = 12040
Iceland 4A	Kd = 5,6 nM
	N = 6735.

L'affinité apparente du récepteur LDL pour leur ligand naturel, les LDL, n'est pas significativement différente d'une lignée à une autre, bien que EBV 82 ait une affinité plus élevée que M. F.

Le nombre de sites récepteurs pour l'apoB des LDL à la surface des cellules Iceland 4A est diminué de moitié par rapport aux cellules normales.

La lignée Iceland 4A, déterminée génétiquement comme hétérozygote pour l'hypercholestérolémie familiale (délétion des exons 9 et 10 du gène du récepteur LDL), exprime la moitié moins de récepteurs actifs que les cellules normales, mais ses récepteurs ont la même affinité pour les LDL que les récepteurs des cellules normales (M. F.).

A 37°C, le métabolisme des LDL par la lignée Iceland 4A est réduit de moitié par rapport au métabolisme des LDL par la lignée normale M. F.

IV.3. Etude de la fixation à 4°C des LDL par immunocytofluorimétrie indirecte

IV.3.1. Méthode

10⁶ lymphoblastes sont incubés avec une concentration fixe (25 µg/ml) de LDL dans un volume final de 250 µl de tampon C (PBS 0,01 M + CaCl₂ 0,5 mM + SAB 2%) pendant 45 minutes à 4°C. Cette incubation est

réalisée dans des boîtes de 96 cupules préalablement saturées pendant 24 heures à 37°C avec du milieu RPMI/SAB.

La plaque 96 puits est centrifugée à 1500 t/mn pendant 5 minutes. Puis les lavages et les incubations successives (LDL puis anti-apoB puis FITC-Ig) sont réalisés comme pour l'étude sur les lymphocytes.

Après le lavage final en tampon C puis un lavage en PBS 0,01 M, les cellules sont reprises par 200 µl de PBS, transférées dans des tubes à hémolyse et immédiatement analysées par un cytofluorographe 50 H (Orthodiagnostic System) équipé de 2 LASER ion-argon et hélium-néon comme il l'a été décrit précédemment (cf chapitre II III.1.4.).

IV.3.2. Résultats

Les résultats obtenus par cette méthode avec la souche normale EBV 82 et la souche Iceland 4A sont illustrés par la figure 9. Le même profil que celui de EBV 82 a été obtenu avec la lignée M. F. (maximum de cellules fluorescentes à 163 sur l'échelle logarithmique).

20 à 30% des cellules incubées seulement avec le FITC-Ig (fixation non spécifique) ont une fluorescence supérieure au seuil de détection de l'appareil. Le maximum de cellules fluorescentes se trouvent à 100 sur l'échelle logarithmique, quelle que soit la lignée cellulaire.

Quand les cellules sont incubées avec le système LDL-anti LDL-FITC-Ig, une grande différence est observée entre les souches normales et la lignée Iceland 4A.

Bien que toutes les cellules soient fluorescentes (100% de cellules fluorescentes), le pic du maximum de cellules fluorescentes est décalé vers la droite, c'est-à-dire vers les plus fortes intensités de fluorescence, pour EBV 82. A la surface de EBV 82, il y a plus de sites récepteurs des LDL que sur Iceland 4A.

Ceci est tout à fait en accord avec les résultats obtenus en utilisant la radioactivité, et avec les données sur la génétique du récepteur LDL des cellules Iceland 4A.

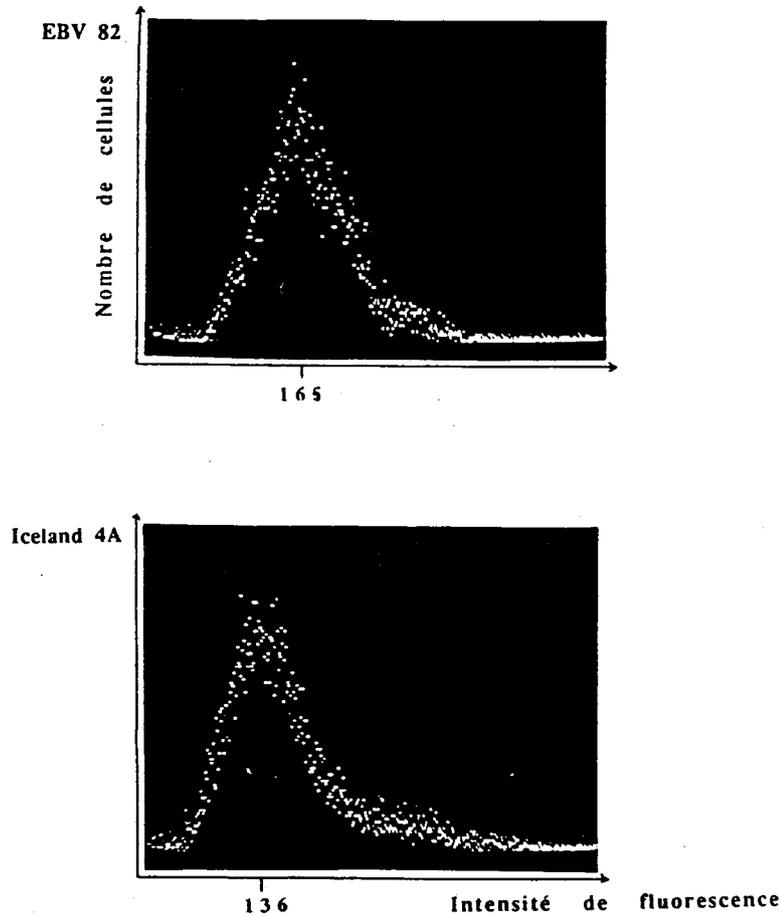


Figure 9 : Distribution de la fluorescence des lignées lymphoblastiques après immunocytofluorimétrie indirecte.

Les cellules sont incubées à 4°C pendant 45 minutes successivement avec des LDL (25 µg/ml), un anticorps polyclonal de lapin anti-LDL humaines (50 µg/ml) et un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin marqué à la fluorescéine (1/20).

En abscisse : intensité de fluorescence, échelle logarithmique, unités arbitraires.

En ordonnée : nombre de cellules.

IV.4. Etude de la fixation et de l'internalisation des LDL fluorescentes par cytométrie de flux

IV.4.1. Méthode

a. Marquage fluorescent des LDL

Les LDL sont préparées et traitées comme il a été précédemment décrit (cf Chapitre II III.1.1.).

b. Technique de dosage du récepteur LDL

10^6 cellules sont incubées avec 25 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL dans un volume final de 250 μl de tampon C pendant 5 heures à 37°C. Cette incubation est réalisée dans des boîtes à 96 puits préalablement saturées pendant 24 heures à 37°C avec 250 μl de milieu RPMI/SAB.

Après cette incubation, les cellules sont lavées deux fois en tampon C et une fois en PBS 0,01 M (centrifugation des boîtes à 1500 t/mn pendant 5 minutes).

Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 200 μl de PBS 0,01 M, transférées dans des tubes à hémolyse et immédiatement analysées en cytométrie de flux.

Un témoin d'autofluorescence (cellules incubées en tampon C) est analysé en même temps pour chaque lignée cellulaire. Quand les cellules sont dans un même état de division, les autofluorescences de différentes lignées sont très proches. Par contre, des autofluorescences différentes témoignent d'un état de culture différent. Notre souci est donc de cultiver différentes souches de la même façon, pour avoir la même autofluorescence de départ.

La fixation-internalisation non spécifique est évaluée par incubation des cellules avec les DiI-LDL et des LDL non fluorescentes en excès (1 mg/ml).

Compte tenu de l'équipement du cytofluoromètre, le DiI est excité à 488 nm. L'émission de fluorescence est mesurée au dessus de 575 nm.

IV.4.2. Résultats

Pour les trois lignées cellulaires étudiées, 8 à 15% des cellules ont une autofluorescence supérieure à la fluorescence seuil déterminée

par l'appareil. Le pic du maximum de cellules fluorescentes est à environ 70 sur l'échelle logarithmique de l'intensité de fluorescence.

Quand les cellules sont incubées en présence des DiI-LDL, elles fixent et internalisent les lipoprotéines.

L'intensité de fluorescence des cellules est alors directement à relier à la quantité de LDL métabolisées par la lignée étudiée (nous considérons que le marquage des LDL au DiI est homogène pour toutes les lipoprotéines).

Les cellules des lignées normales EBV 82 et M. F. ont une intensité de fluorescence plus forte que les cellules Iceland 4A (Figure 10). Le profil de la lignée EBV 82 est exactement superposable à celui de la lignée M. F. La différence entre cellules normales et cellules hétérozygotes FH est tout à fait significative.

Quand les cellules sont incubées avec les DiI-LDL et l'excès de LDL non marquées, leur fluorescence revient à une valeur très proche de leur autofluorescence (76, 78 et 68 sur l'échelle des intensités pour les lignées EBV 82, M. F. et Iceland 4A).

Cela confirme que nous étudions le métabolisme des LDL par la voie spécifique des récepteurs et que, une fois incorporé aux lipoprotéines, le DiI ne se transfère ni aux lipoprotéines non marquées, ni aux membranes cellulaires.

Les résultats montrent donc que la lignée cellulaire Iceland 4A fixe et internalise moins les LDL que les lignées normales EBV 82 et M. F.

IV.5. Conclusion

Les méthodes décrites ici sont simplifiées par rapport aux autres méthodes précédemment publiées (Ho et al., 1976a ; Benhamamouch et al., 1988) grâce à l'utilisation de boîtes multicupules (96 puits). Cela réduit considérablement les manipulations lors des centrifugations et permet de réaliser un grand nombre de points et donc de comparer, simultanément, différentes souches de cellules. Ces méthodes peuvent être appliquées aux

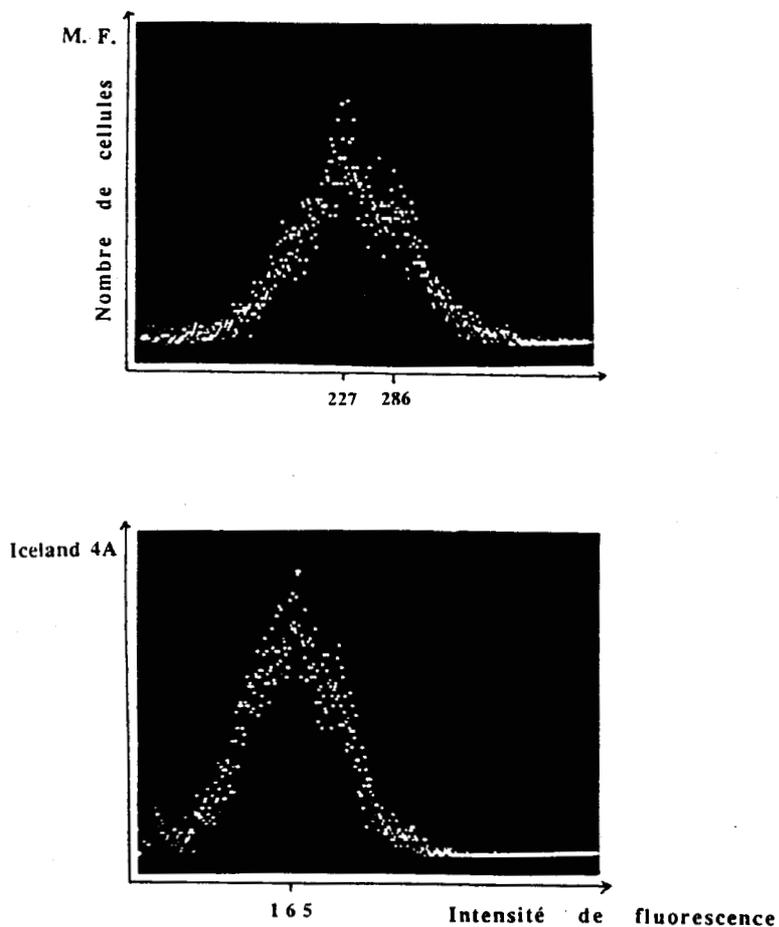


Figure 10 : Distribution de la fluorescence des lignées lymphoblastiques après incubation pendant 5 heures à 37°C avec les DiI-LDL (25 µg/ml).

En abscisse : intensité de fluorescence, échelle logarithmique, unités arbitraires.

En ordonnée : nombre de cellules.

lymphoblastes qui ont l'avantage d'être en culture et donc permettent un grand nombre d'expérimentations.

Très récemment, Lombardi et al. (1990) ont montré que le récepteur LDL des lymphoblastes avait les mêmes caractéristiques que celui des fibroblastes et d'autres types cellulaires précédemment décrits (lymphocytes).

Tous les résultats confirment que le récepteur LDL des cellules préparées à partir du patient hétérozygote pour l'hypercholestérolémie familiale a une activité réduite.

Par la technique de cytométrie de flux avec les LDL fluorescentes, les différences observées entre les cellules transformées normales et les cellules hétérozygotes FH sont plus importantes qu'entre les lymphocytes normaux et homozygotes FH. Les lymphoblastes sont des cellules en division, qui ont donc un besoin important en cholestérol pour la synthèse de leur membranes. Pendant les 5 heures d'incubation, elles incorporent donc une plus grande quantité de LDL fluorescentes que les lymphocytes qui ne se divisent pas. Ce test, avec les LDL fluorescentes, devient alors plus sensible quand nous utilisons les lymphocytes transformés par le virus Epstein-Barr et permet de différencier les cellules présentant un défaut sur un allèle du gène du récepteur LDL par rapport aux cellules d'un sujet normal.

L'utilisation des DiI-LDL (1 incubation) réduit le temps de manipulation par rapport à l'immunocytofluorimétrie indirecte (3 incubations). Son coût réduit et son faible danger biologique peuvent être un avantage par rapport à l'Iode ^{125}I .

Cependant les ^{125}I -LDL permettent d'obtenir des informations quantitatives sur l'affinité et le nombre de récepteurs LDL par cellules.

Nous proposons donc que les DiI-LDL soient utilisées pour étudier les lymphoblastes préparés à partir des lymphocytes de sujets suspectés d'avoir des récepteurs LDL défectueux.

Quand cela est nécessaire, d'autres expérimentations peuvent être réalisées sur ces mêmes cellules en culture (technique de radioligand) pour obtenir de plus amples informations et confirmer à 4°C les résultats obtenus à 37°C.

V. ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS LDL SUR CELLULES U937 ET MONOCYTES-MACROPHAGES HUMAINS

Les lésions athéromateuses et xanthomateuses se caractérisent par une accumulation de cellules chargées en lipides. Beaucoup d'études ont montré que la plupart de ces cellules spumeuses dérivent des macrophages et monocytes (Brown et Goldstein, 1983).

Nous avons étudié la fixation-internalisation à 37°C des DiI-LDL et des DiI-LDL acétylées sur des cellules U937 et des monocytes-macrophages. Les cellules U937 sont une lignée monocytique humaine.

Nous voulions étudier la sensibilité de notre technique avec des ligands marqués au DiI et comparer nos résultats avec ceux décrits dans la littérature (Berg et al., 1986a ; Suzuki et al., 1990).

V.1. Matériels et méthodes

V.1.1. La culture des cellules

a. Les cellules U937

Les cellules U937 sont utilisables comme modèle de macrophages (macrophage-like).

Elles ont perdu leur capacité de synthèse endogène du cholestérol. Elles ont donc besoin de cholestérol exogène pour se diviser.

Les cellules sont ensemencées à environ 10^5 cellules par ml (4 ml par puits) dans du milieu DMEM contenant 10% de SVF ou 10% de LPDS. Au troisième jour de culture, les cellules incubées en DMEM/SVF reçoivent 1 ml de DMEM/SVF neuf et les cellules incubées en milieu DMEM/LPDS reçoivent 1 ml de DMEM/LPDS contenant une concentration croissante de LDL (0 à 15 $\mu\text{g/ml}$). Chaque jour, nous comptons les cellules à l'aide d'une cellule de Malassez.

Nos résultats (Figure 11) sont tout à fait en accord avec ceux de Esfahani et al. (1984). Les cellules cultivées en milieu sans lipoprotéines (DMEM/LPDS) ne peuvent se développer que pendant une génération environ.

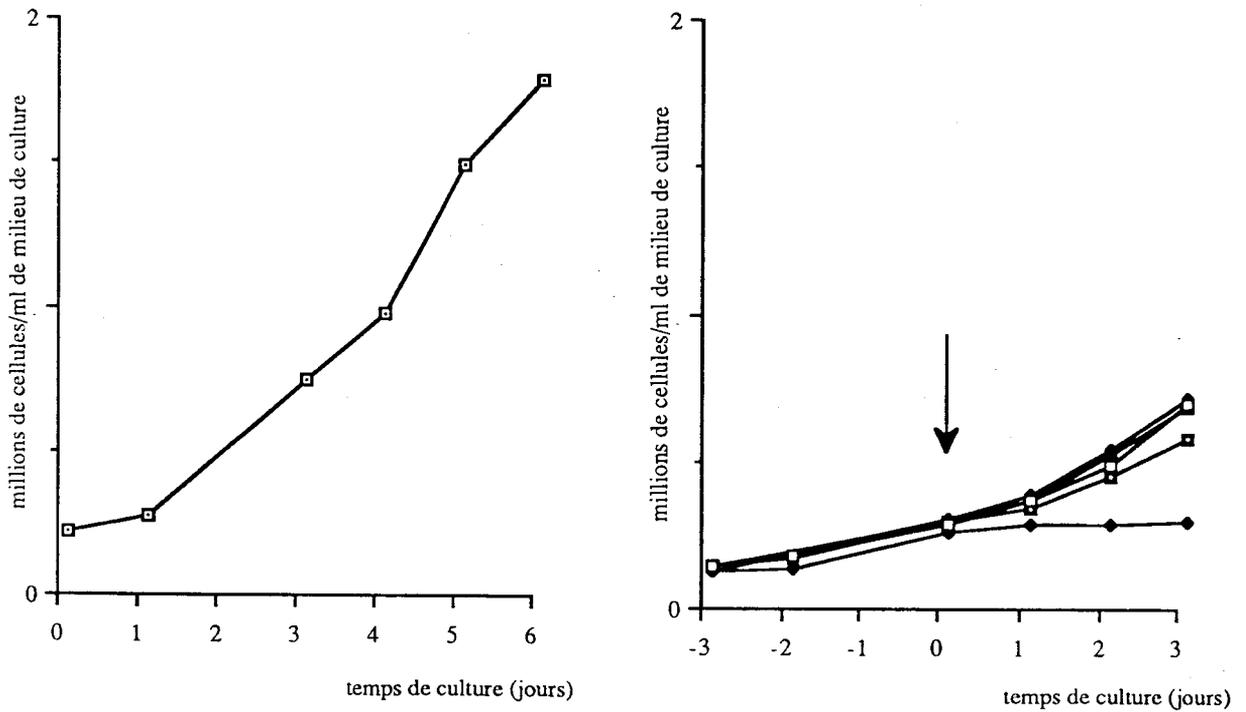


Figure 11 : Croissance des cellules U937 en fonction du milieu de culture.

Les cellules sont incubées en milieu DMEM/SVF ou DMEM/LPDS.
Au troisième jour, les cellules reçoivent 1 ml de milieu neuf.

- SVF
- ◆ LPDS
- LPDS + LDL 2.5 µg/ml
- ◆ LPDS + LDL 5 µg/ml
- LPDS + LDL 10 µg/ml
- LPDS + LDL 15 µg/ml

Par contre, si le milieu est additionné de LDL, les cellules recommencent à se diviser et leur croissance devient parallèle à la croissance des cellules en DMEM/SVF.

Ces cellules sont donc cultivées en milieu DMEM/SVF. Ce sont des cellules en suspension mais qui ont tendance à se grouper au fond de la boîte de culture. Deux fois par semaine, le milieu est aspiré et remplacé par du milieu neuf.

Du fait de leur besoin en cholestérol exogène, ces cellules ne seront pas préincubées en milieu sans lipoprotéines avant le dosage de l'activité des récepteurs aux lipoprotéines.

b. Les monocytes-macrophages humains

L'isolement des monocytes humains se fait à partir de sang fraîchement prélevé sur citrate (Fiche technique n°10).

Les cellules mononucléaires sanguines sont mises en culture dans du milieu RPMI contenant 20% de sérum humain décomplémenté. Après 2 heures à 37°C, les monocytes sont adhérents. Les lymphocytes sont éliminés, et la culture de monocytes est lavée par du milieu RPMI. Le milieu RPMI/sérum humain 20% est changé une fois par semaine.

Le récepteur des lipoprotéines est étudié après 1, 4, 7 jours de culture. Au cours de cette culture, les monocytes se transforment en macrophages.

V.1.2. Les lipoprotéines

Les LDL sont acétylées selon la méthode de Basu et al. (1976) (Fiche technique n°3).

Les LDL natives et acétylées sont marquées au DiI (Fiche technique n°6).

Les LDL natives, les LDL acétylées (AcLDL), les DiI-LDL et les LDL acétylées fluorescentes (DiI-AcLDL) sont déposées sur un gel lipofilm et soumises à un champ électrique. Nous pouvons ainsi contrôler la modification de charge des LDL acétylées. Par contre, le marquage au DiI ne modifie pas la charge électrophorétique des LDL (Figure 12) (Fiche technique n°4).

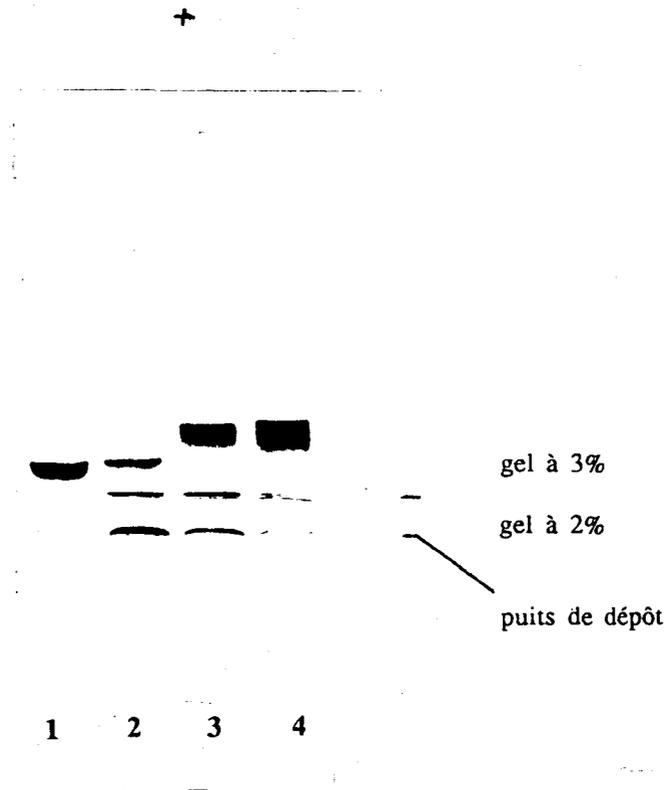


Figure 12 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide (Lipofilm SEBIA)

- 1 : LDL natives
- 2 : DiI-LDL
- 3 : LDL acétylées (AcLDL)
- 4 : DiI-AcLDL

V.1.3. Technique de dosage

La technique choisie pour l'étude des récepteurs des lipoprotéines sur les cellules U937 et les monocytes-macrophages est celle utilisant les lipoprotéines fluorescentes.

Une seule incubation des cellules est réalisée pendant 5 heures à 37°C avec :

- milieu RPMI (autofluorescence)
- ou DiI-LDL 25 µg/ml
- ou DiI-LDL 25 µg/ml + LDL 500 µg/ml
- ou DiI-LDL 25 µg/ml + AcLDL 500 µg/ml
- ou DiI-AcLDL 25 µg/ml
- ou DiI-AcLDL 25 µg/ml + LDL 500 µg/ml
- ou DiI-AcLDL 25 µg/ml + AcLDL 500 µg/ml

Les cellules U937 sont transférées dans des tubes microfuges et lavées 2 fois en tampon C et 1 fois en PBS 0,01 M. Les cellules sont ensuite reprises dans 200 µl de PBS 0,01 M et analysées en cytométrie de flux.

Les monocytes sont détachés de la surface de la boîte par incubation pendant 10 minutes à 37°C avec du PBS 0,01 M - Na₂ EDTA 0,2% (Via et al., 1989). Les cellules sont lavées et traitées comme les cellules U937.

V.2. Résultats

V.2.1. Les cellules U937

Le tableau V reprend les résultats obtenus au cours de 5 expérimentations sur les cellules U937. La figure 13 illustre une des manipulations.

L'autofluorescence des cellules est estimée par incubation avec du milieu RPMI. Les cellules sont excitées par une longueur d'onde de 488 nm. L'émission de fluorescence est analysée à une longueur d'onde supérieure à 575 nm. Le pic d'autofluorescence est réglé au début de

Autofluorescence	93	92	93	163	153
DiI-LDL	223	210	196	271	221
DiI-LDL + LDL	124	118	105	183	164
DiI-LDL + AcLDL	210	209	205	200	208
DiI-AcLDL	126	129	115	185	162
DiI-AcLDL + LDL	120	123	106	182	157
DiI-AcLDL + AcLDL	107	108	96	172	153

Tableau V : Intensité de fluorescence des cellules U937 (unités arbitraires sur l'échelle logarithmique) après incubation pendant 5 heures à 37°C avec des lipoprotéines fluorescentes avec ou sans excès de lipoprotéines non marquées. L'autofluorescence est mesurée après incubation des cellules dans un milieu RPMI/SAB.

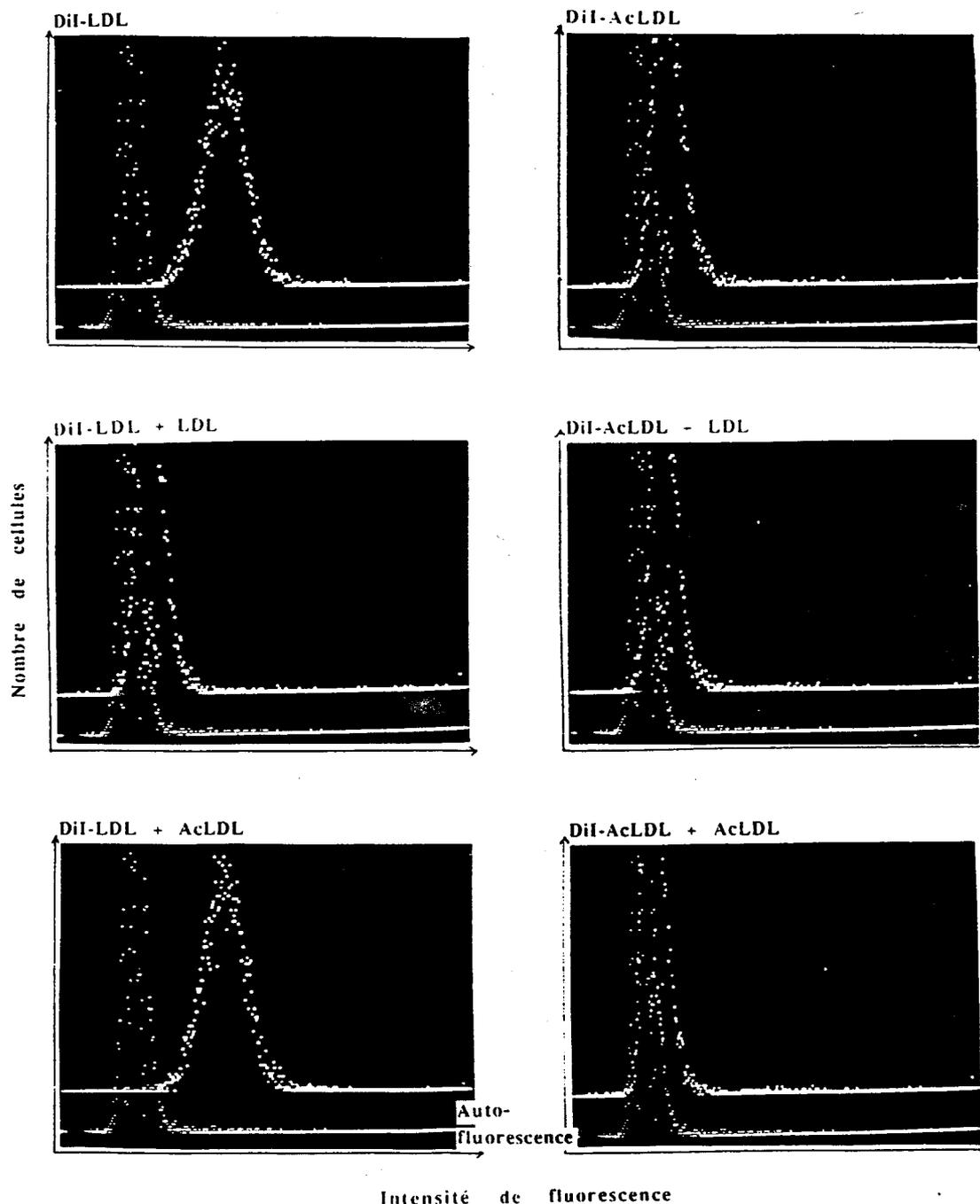


Figure 13 : Distribution de la fluorescence des cellules U937 après incubation à 37°C pendant 5 heures avec des DiI-LDL ou des DiI-AcLDL, en présence ou non d'un excès de lipoprotéines non fluorescentes.

Un témoin d'autofluorescence est réalisé en incubant les cellules dans un milieu sans lipoprotéines fluorescentes.

En abscisse : intensité de fluorescence, échelle logarithmique, unités arbitraires.

En ordonnée : nombre de cellules.

chaque lecture au cytofluoromètre. La position du pic d'autofluorescence, sur l'échelle logarithmique des intensités de fluorescence, est donc déterminée arbitrairement.

Les cellules U937 fixent et internalisent les DiI-LDL.

Les AcLDL en excès n'inhibent pas la fixation-internalisation des DiI-LDL. Par contre, les cellules incubées avec les DiI-LDL et un excès de LDL non marquées ont une fluorescence très proche de l'autofluorescence. La fixation et l'internalisation des LDL natives se font par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, le récepteur LDL.

Les cellules U937 fixent et internalisent les DiI-AcLDL.

La fluorescence des cellules est très proche de celle observée lors de la fixation non spécifique des DiI-LDL (incubation DiI-LDL + excès LDL) donc très proche de l'autofluorescence. Un excès de LDL non fluorescentes ne déplace pas le pic, par contre un excès de Ac-LDL diminue l'intensité de fluorescence.

Les récepteurs (LDL et Ac-LDL) coexistent donc sur les cellules U937 bien que le récepteur LDL soit beaucoup plus exprimé.

Les cellules U937 expriment à leur surface un nombre important de récepteurs LDL.

Il existerait des récepteurs capables de reconnaître spécifiquement les LDL modifiés. Cependant, l'incorporation des LDL acétylées est très réduite par rapport à celle des LDL natives.

Nos résultats sont intermédiaires entre ceux de Via et al. (1985) et Suzuki et al. (1990). Via et al. montrent que les cellules U937 peuvent dégrader les LDL mais non les AcLDL. Par contre Suzuki et al. ont trouvé une fixation et une internalisation des AcLDL au niveau des cellules U937.

Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des différences de conditions de culture, par la source différente des cellules, par une expression différente des récepteurs.

Frostegard et al. (1990a) confirment que les cellules U937 ne synthétisent pas le cholestérol endogène et que leur croissance dépend de la fixation des LDL sur leur récepteur. L'étude de la croissance de ces

cellules peut déterminer les propriétés de fixation de LDL pathologiques par rapport à des LDL témoins.

V.2.2. Les monocytes-macrophages humains

Des monocytes-macrophages humains après 24 heures de culture (Tableau VI) expriment les deux types de récepteurs :

- récepteurs aux LDL natives,
- récepteurs aux LDL modifiées.

Les cellules semblent cependant incorporer plus de LDL acétylées.

A 4 et 7 jours, les cellules métabolisent de plus en plus de LDL, qu'elles soient natives ou acétylées.

L'excès de ligand froid ne suffit pas pour déplacer la totalité des DiI-LDL et DiI-AcLDL.

La figure 14 illustre la manipulation réalisée au quatrième jour de culture.

V.3. Conclusion

Nous avons donc confirmé que les cellules U937 ne peuvent pas se diviser dans un milieu sans cholestérol exogène. Elles fixent et internalisent les LDL par la voie de récepteurs spécifiques. Elles expriment à leur surface un nombre limité de récepteurs aux LDL modifiées. Leur croissance dépend essentiellement de l'intégrité des fonctions de fixation des LDL présentes dans le milieu de culture (Frostegard, 1990a).

Des macrophages ont été isolés des plaques athéromateuses de sujets atteints d'hypercholestérolémie familiale (FH) et de patients hypercholestérolémiques non FH. Ces cellules ont accumulé des LDL et se sont gorgées de lipides. La formation de ces cellules spumeuses se fait par l'accumulation de LDL modifiées et non de LDL natives dont elles ne présentent que peu de récepteurs. Il est possible que les LDL oxydées par les cellules endothéliales stimulent la transformation des monocytes de l'intima en macrophages activés qui vont ensuite se transformer en cellules spumeuses de la plaque d'athérome (Frostegard et al., 1990b).

	24 heures	24 heures	4 jours	7 jours
Autofluorescence	73	116	91	97
DiI-LDL	93	146	166	238
DiI-LDL + LDL	86	120	135	225
DiI-LDL + AcLDL	93	142	135	118
DiI-AcLDL	130	220	233	299
DiI-AcLDL + LDL	129	199	241	310
DiI-AcLDL + AcLDL	91	130	164	256

Tableau VI : Intensité de fluorescence des monocytes-macrophages en fonction du temps de culture après incubation à 37°C avec des lipoprotéines fluorescentes.

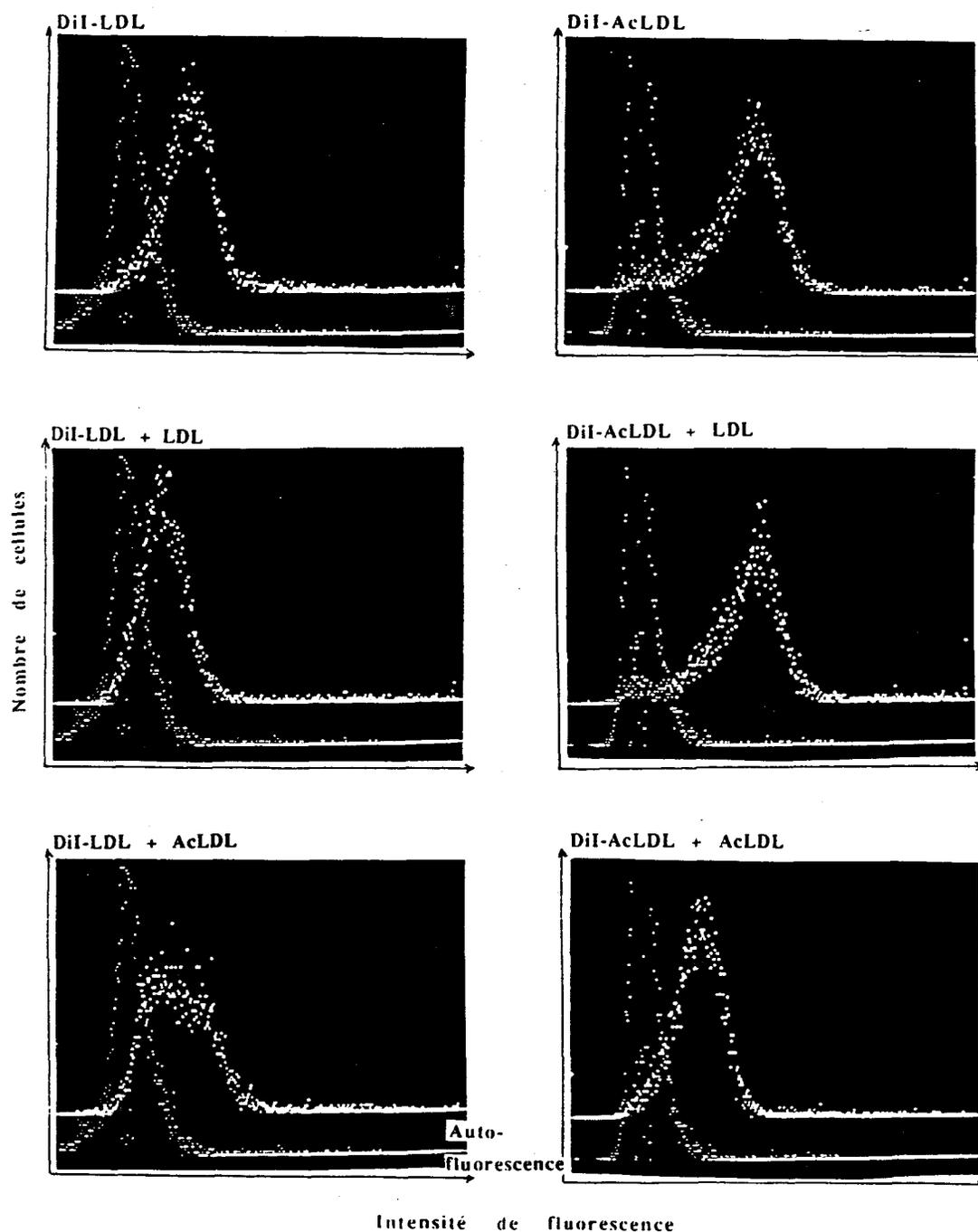


Figure 14 : Distribution de la fluorescence des monocytes-macrophages après 4 jours de culture et incubation pendant 5 heures à 37°C avec des DiI-LDL ou des DiI-AcLDL, en présence ou non d'un excès de lipoprotéines non fluorescentes.

Un témoin d'auto fluorescence est réalisé en incubant les cellules dans un milieu sans lipoprotéines fluorescentes.

En abscisse : intensité de fluorescence, échelle logarithmique, unités arbitraires.

En ordonnée : nombre de cellules.

La fixation et l'internalisation des LDL modifiées se font par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique : le scavenger récepteur (Brown et Goldstein, 1990 ; Kodama et al, 1990 ; Roher et al., 1990).

Des travaux très récents de Pitas (1990) montrent chez le lapin que ce scavenger récepteur peut aussi être exprimé au niveau des fibroblastes et des cellules musculaires lisses.

La captation des LDL modifiées est stimulée par :

- le facteur de croissance M-CSF (Ishibashi et al., 1990),
- le milieu de culture contenant du sérum,
- les produits de sécrétion des plaquettes,
- les esters de phorbol (Pitas, 1990).

Nous avons montré que lors de la transformation monocytes -> macrophages (culture des monocytes en milieu contenant du sérum humain) le métabolisme du cholestérol évolue. En effet les besoins de la cellule transformée sont satisfaits par la captation de LDL modifiées par une voie différente de celle des récepteurs LDL.

Les techniques de cytofluorimétrie avec des LDL fluorescentes sont particulièrement adaptées à ce type de cellules comportant deux types de récepteurs. En effet, il est aisé de séparer la fixation spécifique de la fixation non spécifique par incubation des cellules avec un ligand fluorescent (LDL ou LDL modifiées) et un excès de ligand non marqué. Cependant, la quantification réelle de chaque récepteur reste difficile.

CHAPITRE III

ETUDE DE

DIFFERENTS CAS

D'HYPERCHOLESTEROLEMIE

I. INDIVIDUS SELECTIONNES CLINIQUEMENT HETEROZYGOTES POUR L'HYPERCHOLESTEROLEMIE FAMILIALE

Dans la plupart des études publiées, le critère de classification des hypercholestérolémies est basé sur le diagnostic clinique. Ainsi les xanthomes, l'athérosclérose précoce, l'hypercholestérolémie modérée ou sévère sont les manifestations majeures de l'hypercholestérolémie familiale (FH) (Brown et Goldstein, 1975 ; Yamamoto et al., 1989). Ces signes cliniques associés à l'existence d'antécédents familiaux d'hypercholestérolémie et/ou de maladie cardiovasculaire sont considérés comme suffisants pour la classification des patients dans le type FH.

Nous avons sélectionné 41 patients hypercholestérolémiques sur la base de la présence de xanthomes et/ou d'antécédents personnels ou familiaux de maladie cardiovasculaire. Nous avons classé ces patients en tenant compte de la fixation des LDL sur leurs lymphocytes en utilisant une technique d'immunocytofluorimétrie indirecte (Benhamamouch et al., 1988). Nous avons essayé de corrélér l'activité de leurs récepteurs LDL avec leur profil lipidique (lipides, apolipoprotéines et lipoprotéines).

Une étude en double aveugle a été entreprise sur les 41 sujets précédemment sélectionnés pour comparer l'efficacité de la simvastatine et du fénofibrate en fonction de l'expression des récepteurs LDL des lymphocytes.

Le fénofibrate et la simvastatine sont des hypocholestérolémiants (Alberts et al. 1980 ; Blene et al., 1986). La simvastatine inhibe l'HMG CoA réductase, provoquant ainsi une diminution de la synthèse du cholestérol. La diminution de la concentration cellulaire en cholestérol provoque une stimulation de la production des récepteurs LDL hépatiques, augmentant le catabolisme des LDL par la voie des récepteurs spécifiques. Le fénofibrate stimule l'activité de la lipoprotéine lipase, accélérant la cascade lipolytique des lipoprotéines de très basse densité. Il pourrait inhiber l'activité de l'HMG CoA réductase de manière indirecte.

I.1. Matériels et méthodes

I.1.1. Les sujets et le protocole d'étude

Cette étude est réalisée sur 41 sujets souffrant d'hypercholestérolémie essentielle (xanthomes et/ou maladie cardiovasculaire et antécédents familiaux) et suivis régulièrement en consultation dans le service d'endocrinologie du Professeur De Gennes.

Pour tous les sujets l'analyse de l'activité des récepteurs LDL est réalisée sur les lymphocytes. Pour 15 sujets, l'analyse a aussi été réalisée sur les fibroblastes.

Les lipides, apolipoprotéines et lipoprotéines sont mesurés après 4 semaines sans aucun traitement et 4 semaines de placebo.

Pendant les périodes sans traitement, de placebo puis de traitement (fénofibrate ou simvastatine), les patients suivent un régime standard pauvre en lipides.

Les patients entrent en période de placebo si le cholestérol plasmatique et le cholestérol-LDL sont au dessus de 3,0 et 1,95 g/l respectivement.

Après 4 semaines de placebo, l'un des deux traitements suivants est attribué aux patients de façon aléatoire :

- simvastatine 20 mg/jour,
- fénofibrate 200 mg/jour.

Après 6 semaines de traitement, les lipides, les lipoprotéines et les apolipoprotéines sont dosés comme après la période de placebo (6 patients sont exclus après les 6 semaines de traitement).

I.1.2. L'étude des récepteurs LDL

Les lymphocytes sont isolés selon la méthode de Boyüm, 1968 (Fiche technique n°10).

Après incubation des lymphocytes pendant 72 heures en milieu RPMI contenant 1% p/v de SAB et 300 µg HDL₃/ml, l'activité des récepteurs LDL est analysée par une technique d'immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C (Fiche technique n°12) en incubant les lymphocytes successivement avec :

- LDL 25 µg/ml,
- anticorps anti-LDL 50 µg/ml,
- anticorps marqué à la fluorescéine (FITC-Ig)1/20 v/v.

Les lymphocytes sont ensuite analysés par un Orthocytofluorographe 50H (Orthodiagnostic system Westwood). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dont l'intensité de fluorescence est supérieure au seuil déterminé pour l'appareil. Ces résultats sont ensuite comparés à ceux obtenus avec les lymphocytes d'un sujet normal traités de la même façon lors de la même expérimentation.

Les fibroblastes sont mis en culture à partir d'une biopsie de peau réalisée chez 15 patients.

La fixation, l'internalisation et la dégradation des ¹²⁵I-LDL par ces cellules sont mesurées selon la méthode décrite par Goldstein et Brown (Goldstein et Brown, 1974 ; Fiche technique n°11).

La fixation, l'internalisation et la dégradation spécifiques sont calculées par différence entre l'activité totale et l'activité non spécifique mesurée en présence d'un excès de LDL non marquées (20 fois la concentration des ¹²⁵I-LDL).

Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec les fibroblastes d'un sujet normal et d'un sujet hétérozygote FH (mère d'un sujet homozygote FH).

I.1.3. Les bilans lipidiques

Le cholestérol, les triglycérides et les phospholipides sont mesurés dans le sérum total par des méthodes enzymatiques (Boehringer Mannheim, FRG et Biomérieux, France). Le cholestérol et les phospholipides sont mesurés dans les VLDL séparées par ultracentrifugation séquentielle (Havel et al., 1955) et le surnageant après précipitation au phosphotungstate de sodium (cholestérol-HDL). Le cholestérol-LDL et les phospholipides des LDL sont estimés par différence entre ces résultats.

Les apos A-I et B sont analysées en immunonéphélométrie (Berhing, FRG).

Les apos C-III et E sont mesurées par immunoenzymométrie (Fruchart et al., 1985).

Les lipoprotéines contenant simultanément les apos A-II et A-I (LpA-II:A-I), les apos C-III et B (LpC-III:B), les apos E et B (LpE:B) ou les apos (a) et B (Lp(a):B) sont quantifiées par une technique immunoenzymométrique double site. Le principe général est présenté dans la figure 1A. Si les anticorps sont identiques (anti-apoB par exemple), cette technique permet de doser toutes les lipoprotéines contenant l'apoB. Par contre, si les deux anticorps sont dirigés contre deux apolipoprotéines différentes, nous doserons toutes les lipoprotéines contenant au moins ces deux apolipoprotéines (Fruchart et al., 1985).

Les lipoprotéines contenant l'apoA-I mais non l'apoA-II (LpA-I) sont quantifiées par électroimmunodiffusion. Les lipoprotéines sont exposées à un très large excès d'anti-apoAII. Les lipoprotéines contenant l'apoA-II sont précipitées près du puits de dépôt. Ne migreront et seront révélées que les lipoprotéines contenant l'apoA-I mais pas l'apoA-II.

Les significations statistiques sont évaluées par le test apparié de Willcoxon (comparaison intra-groupe) et par le test de Mann et Whitney (comparaison inter-groupe).

Des tests de corrélation ont été effectués entre l'expression des récepteurs LDL et les bilans lipidiques avant et après traitement.

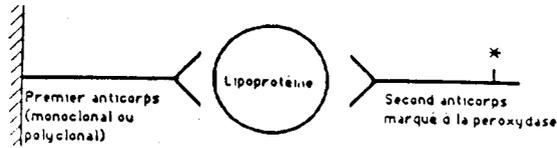
I.2. Résultats

Sur les 41 sujets étudiés :

- 9 sujets ont une fixation normale des LDL sur leurs lymphocytes (>75% de la fixation normale),
- 4 sujets ont une fixation des LDL entre 60 et 75% de la fixation normale,
- 28 sujets ont une fixation des LDL entre 30 et 60% de la fixation normale.

La fixation des ^{125}I -LDL (10 $\mu\text{g/ml}$) à 4°C, l'internalisation et la dégradation à 37°C sont étudiées sur les fibroblastes de 15 sujets :

Principe Général



Méthode à double détermination d'anticorps

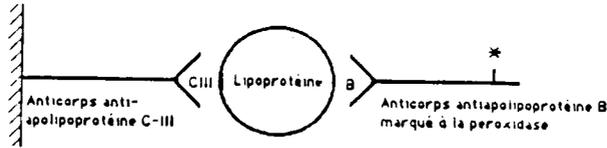


Figure 1A : Dosage immuno-enzymatique des apolipoprotéines et des lipoprotéines.

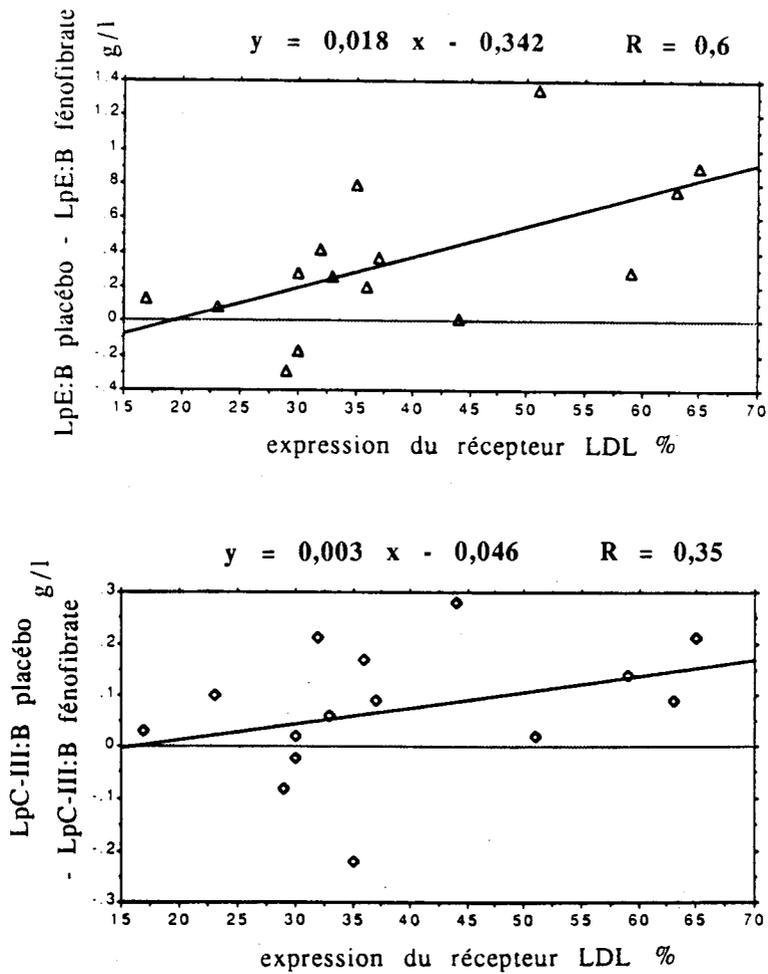


Figure 1B : Variations chez les sujets traités au fénofibrate des lipoprotéines complexes LpE:B et LpC-III:B en fonction de l'activité des récepteurs LDL des lymphocytes exprimée en pourcentage de cellules fluorescentes après immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C.

- 8 sujets dont la fixation des LDL est normale sur les lymphocytes,
- 3 sujets dont la fixation des LDL est intermédiaire sur les lymphocytes,
- 4 sujets dont la fixation des LDL est déficiente sur les lymphocytes.

Les résultats sont présentés dans le tableau I.

Pour ces 15 patients, la fixation des LDL à 4°C sur les lymphocytes est comparable à la fixation des LDL à 4°C sur les fibroblastes.

Pour 7 patients dont l'activité des récepteurs LDL est normale sur lymphocytes, l'internalisation et la dégradation des ¹²⁵I-LDL sur fibroblastes sont aussi normales. Pour B18, la fixation à 4°C sur fibroblastes est presque normale mais l'internalisation et la dégradation sont déficientes.

Le tableau II compare les concentrations plasmatiques de lipides, apolipoprotéines et lipoprotéines des deux groupes extrêmes de patients (activité normale ou déficiente des récepteurs LDL, groupes I et III).

Aucune différence significative n'est observée entre ces deux groupes. Les sujets de ces deux groupes ont des concentrations élevées de cholestérol, de phospholipides, de LDL-cholestérol et d'apoB, comme il est décrit pour les sujets hypercholestérolémiques FH.

Le tableau III montre les valeurs obtenues après six semaines de traitement (fénofibrate ou simvastatine) dans chaque groupe et la signification des variations (test de Willcoxon). Le test de Mann et Whitney (test inter-groupe) montre qu'il n'y a toujours pas de différence significative entre ces deux groupes de patients dont l'activité des récepteurs LDL est différente. L'évolution des paramètres lipidiques est similaire dans les deux groupes. Nous observons, comme attendu, une diminution significative des paramètres suivants : cholestérol, triglycérides, phospholipides, LDL-cholestérol, apoB, apoE, apoCIII et lipoprotéines complexes telles que LpCIII:B et LpE:B. Donc, tous traitements confondus, l'effet sur le profil lipidique est le même pour ces patients hypercholestérolémiques, quelle que soit l'activité des récepteurs LDL.

Les valeurs obtenues avec le troisième groupe (n=4 ; activité intermédiaire des récepteurs LDL des lymphocytes) ne sont pas significativement différentes des deux autres groupes (non montré).

	Lymphocytes cytofluoro- rimétrie 4°C	fibroblastes		
		F (4°C)	F + I (37°C)	D (37°C)
B 4	83%	91%	99%	79%
L 7	107%	107%	40%	130%
C 9	109%	100%	132%	106%
F 10	91%	105%	-	-
S 15	96%	98%	99%	95%
A 29	90%	50%	93%	50%
T 38	83%	109%	102%	150%
M 5	75%	92%	98%	116%
R 3	64%	72%	72%	86%
B 18	71%	125%	27%	44%
L 40	62%	64,00%	78%	97%
C 14	49%	73%	25%	36%
C 21	38%	62%	72%	58%
B 22	50%	48%	130%	122%
P 34	40%	46%	79%	50%

Tableau I : Activité des récepteurs LDL des lymphocytes et des fibroblastes. Les résultats sont exprimés en pourcentage des résultats obtenus avec les cellules d'un sujet normal.

La fixation des LDL (25 µg/ml) sur lymphocytes est étudiée par immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C. Les fibroblastes sont étudiés avec 10 µg ¹²⁵I-LDL/ml (2 expérimentations réalisées en quadruplicate).

Concentration plasmatique (g/l)	total n = 41	Groupe I Fixation normale des LDL n = 9	Groupe III Fixation déficiente des LDL n = 27
Cholestérol	3,97 ± 0,96	4,04 ± 0,57	3,97 ± 1,06
Triglycérides	1,42 ± 0,78	1,17 ± 0,283	1,45 ± 0,859
Phospholipides	3,25 ± 0,62	3,25 ± 0,727	3,31 ± 0,611
VLDL-Cholestérol	0,422 ± 0,152	0,448 ± 0,125	0,41 ± 0,149
LDL-Cholestérol	3,10 ± 0,89	3,12 ± 0,462	3,12 ± 1,01
LDL-Phospholipides	1,91 ± 0,575	1,92 ± 0,516	1,95 ± 0,615
HDL-Cholestérol	0,446 ± 0,149	0,478 ± 0,209	0,444 ± 0,128
HDL-Phospholipides	0,972 ± 0,33	0,973 ± 0,454	1,002 ± 0,292
ApoB	2,26 ± 0,60	2,35 ± 0,306	2,21 ± 0,685
ApoA-I	1,27 ± 0,358	1,42 ± 0,514	1,204 ± 0,307
ApoA-II	0,292 ± 0,081	0,304 ± 0,098	0,289 ± 0,084
ApoE	0,093 ± 0,034	0,080 ± 0,031	0,097 ± 0,036
ApoC-III	0,063 ± 0,020	0,058 ± 0,013	0,064 ± 0,023
Lp(a):B	0,206 ± 0,229	0,237 ± 0,247	0,187 ± 0,227
LpA-I	0,438 ± 0,123	0,445 ± 0,135	0,446 ± 0,127
LpA-II:A-I	0,831 ± 0,283	0,889 ± 0,254	0,803 ± 0,302
LpE:B	0,809 ± 0,535	0,946 ± 0,548	0,715 ± 0,376
LpC-III:B	0,322 ± 0,153	0,286 ± 0,069	0,311 ± 0,158
Xanthomes	65% (n = 37)	75% (n = 6)	65% (n = 26)
ACVP	36% (n = 33)	28% (n = 7)	36% (n = 22)
ACVF	76% (n = 29)	67% (n = 6)	90% (n = 20)
AF Hyperchol.	97% (n = 30)	100% (n = 7)	95% (n = 22)

Tableau II : Bilan lipidique, lipoprotéinique et apolipoprotéinique des 41 sujets après la période de placebo (moyenne ± sd).

Les sujets sont classés selon l'expression des récepteurs LDL déterminée sur leurs lymphocytes.

La présence de 4 signes cliniques chez les sujets étudiés est exprimée en pourcentage du nombre de sujets du groupe considéré pour lesquels nous avons l'information;

ACVP et ACVF : antécédents personnels et familiaux de maladie cardiovasculaire.

AF hyperchol. : antécédents familiaux d'hypercholestérolémie.

Concentration plasmatique (g/l)	Groupe I Fixation normale des LDL n = 8	Groupe III Fixation déficiente des LDL n = 23
Cholestérol	2,89 ± 1,022 ↓ **	3,01 ± 0,93 ↓ ***
Triglycérides	0,884 ± 0,232 ↓ **	1,04 ± 0,395 ↓ **
Phospholipides	2,72 ± 0,712 ↓ *	2,73 ± 0,59 ↓ ***
VLDL-Cholestérol	0,235 ± 0,104 ↓ ***	0,264 ± 0,131 ↓ ***
LDL-Cholestérol	2,14 ± 1,00 ↓ **	2,30 ± 0,88 ↓ **
LDL-Phospholipides	1,47 ± 0,622 ↓ *	1,57 ± 0,58 ↓ ***
HDL-Cholestérol	0,518 ± 0,150 NS	0,449 ± 0,130 NS
HDL-Phospholipides	1,045 ± 0,38 NS	0,926 ± 0,28 NS
ApoB	1,33 ± 0,294 ↓ ***	1,523 ± 0,516 ↓ ***
ApoA-I	1,279 ± 0,549 ↓ *	1,197 ± 0,301 NS
ApoA-II	0,391 ± 0,141 NS	0,313 ± 0,104 NS
ApoE	0,059 ± 0,018 ↓ **	0,062 ± 0,017 ↓ ***
ApoC-III	0,049 ± 0,012 NS	0,047 ± 0,010 ↓ **
Lp(a):B	0,116 ± 0,094 NS	0,187 ± 0,223 NS
LpA-I	0,447 ± 0,171 NS	0,449 ± 0,132 NS
LpA-II:A-I	0,961 ± 0,235 NS	0,84 ± 0,21 NS
LpE:B	0,303 ± 0,154 ↓ **	0,425 ± 0,345 ↓ **
LpC-III:B	0,175 ± 0,066 ↓ **	0,216 ± 0,125 ↓ **

Tableau III : Bilan lipidique, lipoprotéinique et apolipoprotéinique (moyenne ± sd) après 6 semaines de traitement (fénofibrate ou simvastatine) des patients classés selon l'expression des récepteurs LDL de leurs lymphocytes et évolution pour chaque groupe des paramètres par rapport à la fin de période placebo (test de Willcoxon, *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; NS : non significatif). La différence entre les groupes I et III n'est jamais significative (test de Mann et Whitney).

Le tableau IV montre la variation des paramètres lipidiques selon le traitement (fénofibrate ou simvastatine), les sujets n'étant pas séparés par groupes d'activité différente des récepteurs LDL.

L'évolution des paramètres lipidiques est comparable sous les deux traitements sauf pour :

- l'apoA-II et la LpA-II:A-I qui augmentent sous fénofibrate et non sous simvastatine,
- l'apoC-III qui diminue sous simvastatine et non sous fénofibrate.

Nous avons effectué des études de corrélation entre l'évolution des concentrations plasmatiques en période placebo et après traitement et l'expression du récepteur LDL sur lymphocytes. Les variations des paramètres lipidiques sont indépendantes de l'expression du récepteur LDL mesurée sur lymphocytes sauf pour les lipoprotéines complexes telles que les LpE:B et LpC-III:B. La concentration de ces particules diminue d'autant plus après traitement sous fénofibrate que les sujets ont une activité élevée des récepteurs LDL (Figure 1B) ($R = 0,6$ pour les LpE:B).

Les tableaux V et VI montrent l'évolution du bilan lipidique de chaque groupe (groupe I : fixation normale des LDL ; groupe III : fixation déficiente des LDL) en fonction du traitement.

La signification de la différence pour chaque groupe entre les deux traitements est indiquée par des astérisques dans le tableau VI (test de Mann et Whitney). Le traitement sous simvastatine des sujets du groupe I aboutit à des concentrations plus basses qu'avec le fénofibrate pour les paramètres suivants : triglycérides, VLDL-cholestérol, apoC-III et LpE:B.

Dans chaque groupe de traitement, les moyennes de chaque paramètre doivent être identiques après période placebo pour confirmer une répartition aléatoire des patients. Ceci n'est pas le cas pour tous les paramètres et en particulier pour les LpE:B et LpC-III:B qui sont plus élevées chez les patients à activité normale des récepteurs LDL (groupe I) qui sont ensuite traités au fénofibrate. Pour ces paramètres, ces deux populations de patients ne peuvent être considérées comme comparables.

Sous simvastatine, l'évolution du bilan lipidique est indépendante de l'expression des récepteurs LDL. Ainsi, sous ce traitement, aucune différence significative n'est observée entre les groupes I et III (test de Mann et Whitney).

Par contre, sous fénofibrate, cette évolution est corrélée à l'activité des récepteurs LDL pour trois paramètres. Les HDL augmentent plus, sous

Concentration plasmatique (g/l)	Fénofibrate n = 15		Simvastatine n = 20	
	Placébo	Traitement	Placébo	Traitement
Cholestérol	3,92	3,12***	4,04	2,84****
Triglycérides	1,24	1,023*	1,43	0,957***
Phospholipides	3,23	2,88**	3,25	2,63****
VLDL-Cholestérol	0,406	0,274**	0,434	0,236****
LDL-Cholestérol	3,093	2,39***	3,14	2,11****
LDL-Phospholipides	1,901	1,667*	1,908	1,406***
HDL-Cholestérol	0,426	0,464 NS	0,462	0,495 NS
HDL-Phospholipides	0,933	0,971 NS	0,994	1,016 NS
ApoB	2,23	1,417****	2,29	1,485****
ApoA-I	1,223	1,186 NS	1,296	1,245 NS
ApoA-II	0,277	0,398***	0,288	0,294 NS
ApoE	0,086	0,065***	0,1	0,058****
ApoC-III	0,055	0,050 NS	0,069	0,048***
Lp(a):B	0,194	0,181 NS	0,225	0,175 NS
LpA-I	0,446	0,43 NS	0,419	0,448 NS
LpA-II:A-I	0,711	0,828**	0,89	0,973 NS
LpE:B	<i>0,694</i>	0,383**	0,894	<i>0,382**</i>
LpC-III:B	<i>0,267</i>	0,195*	0,372	<i>0,219***</i>

Tableau IV : Variation des paramètres lipidiques des sujets à activité normale ou déficiente des récepteurs LDL des lymphocytes après traitement au fénofibrate ou à la simvastatine (par rapport à la fin de période placébo). En italique sont indiqués les paramètres dont les concentrations sont dépendantes de l'activité des récepteurs LDL. Les astérisques indiquent la signification des variations des paramètres (test t, **** : $p < 0,0001$; *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; NS : non significatif).

concentration plasmatique (g/l)	Fénofibrate			
	I (n = 5)		III (n = 11)	
	Placébo	Trait.	Placébo	Trait.
Cholestérol	4,42	3,31	3,75	3,155
Triglycérides	1,27	1,05	1,274	1,061
Phospholipides	3,69	3,17	3,059	2,789
VLDL-Cholestérol	0,504	0,315	0,356	0,273
LDL-Cholestérol	3,42	2,47	3	2,5
LDL-Phospholipides	2,2	1,73	1,837	1,744
HDL-Cholestérol	0,502	0,543	0,39	0,395
HDL-Phospholipides	1,08	1,17	0,871	0,801
ApoB	2,46	1,387	2,139	1,502
ApoA-I	1,462	1,322	1,12	1,115
ApoA-II	0,38	0,453	0,257	0,371
ApoE	0,085	0,071	0,089	0,063
ApoC-III	0,066	0,057	0,049	0,044
Lp(a):B	0,223	0,175	0,154	0,201
LpA-I	0,489	0,471	0,466	0,411
LpA-II:A-I	0,852	0,962	0,644	0,792
LpE:B	<i>1,096</i>	<i>0,405</i>	<i>0,547</i>	<i>0,371</i>
LpC-III:B	<i>0,296</i>	<i>0,203</i>	<i>0,222</i>	<i>0,197</i>

Tableau V : Bilan lipidique des sujets à activité normale (I) ou déficiente (III) des récepteurs LDL sur lymphocytes avant et après traitement sous fénofibrate. En italique sont indiqués les paramètres dont la différence de concentration avant et après traitement est corrélée à l'activité des récepteurs LDL (test de corrélation, Figure 1B). Un test de Mann et Whitney ne montre aucune différence significative avant et après traitement entre les groupes I et III.

concentration plasmatique (g/l)	Simvastatine			
	I (n = 4)		III (n = 11)	
	Placébo	Trait.	Placébo	Trait.
Cholestérol	3,56*	2,47	4,182	2,897
Triglycérides	1,058	0,718*	1,402	1,023
Phospholipides	2,7*	2,26	3,48	2,69
VLDL-Cholestérol	0,377	0,157*	0,446	0,257
LDL-Cholestérol	2,74*	1,81	3,252	2,153
LDL-Phospholipides	1,57*	1,21	2,025	1,438
HDL-Cholestérol	0,448	0,493	0,484	0,491*
HDL-Phospholipides	0,84	0,923	1,085	1,022*
ApoB	2,215	1,273	2,265	1,539
ApoA-I	1,362	1,235	1,237	1,26
ApoA-II	0,3	0,33	0,289*	0,268*
ApoE	0,073	0,047	0,105	0,061
ApoC-III	0,048	0,041*	0,075**	0,049
Lp(a):B	0,256	0,057	0,223	0,177
LpA-I	0,39	0,422	0,431	0,473
LpA-II:A-I	0,935	0,96	0,861*	0,873
LpE:B	0,757	0,200*	0,819	0,466
LpC-III:B	0,273	0,147	0,383**	0,23

Tableau VI : Bilan lipidique des sujets à activité normale (I) ou déficiente (III) des récepteurs LDL sur lymphocytes avant et après traitement sous simvastatine.

La signification des différences avec le fénofibrate est indiquée par les astérisques (test de Mann et Whitney, ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$).

traitement au fénofibrate, pour les sujets du groupe I. Bien que les sujets du groupe I aient des valeurs de LpE:B et LpC-III:B supérieures à celles des sujets du groupe III, sous fénofibrate les LpE:B et les LpC-III:B diminuent plus pour ces patients du groupe I.

La comparaison des moyennes des les groupes I et III selon le traitement confirme donc les résultats obtenus en étudiant la variation continue de chaque paramètre en fonction de l'expression du récepteur LDL sur lymphocytes. Ces données ne permettent pas d'observer de différences significatives entre les groupes I et III en fonction du traitement (sauf pour les LpE:B et LpC-III:B).

I.3. Discussion - Conclusion

Nous avons donc montré que des sujets présentant une hypercholestérolémie, des xanthes et des antécédents cardiovasculaires personnels ou familiaux pouvaient avoir des récepteurs LDL s'exprimant normalement à la surface cellulaire après dérèpression aussi bien sur lymphocytes que sur fibroblastes. Cependant, malgré la présence potentielle de ces récepteurs, l'augmentation de la cholestérolémie, de l'apoB et des lipides des LDL (phospholipides et cholestérol) laisse penser que ces récepteurs sont fortement réprimés *in vivo*. Ceci rend ces patients, sur le plan clinique, indiscernables des sujets hétérozygotes pour un déficit du récepteur LDL. Cette hypothèse est confirmée par l'absence de différences significatives de l'effet du traitement (fénofibrate et simvastatine) entre ces sujets pouvant exprimer des récepteurs normaux après dérèpression cellulaire et les sujets réellement hétérozygotes FH.

Chez les sujets présentant une hypercholestéromémie essentielle, le fénofibrate et la simvastatine ont des effets peu différents sur les lipides du plasma et des lipoprotéines. Ces effets ont été décrits par Bard et al. (N. Eng. J. Med., soumis pour publication 1991) dans une étude incluant une partie de nos malades. Nous retrouvons la plupart de leurs résultats dans notre étude. Quelques données sont cependant moins significatives, certainement à cause du plus faible nombre de sujets :

- Le fénofibrate diminue plus les triglycérides, et la simvastatine diminue plus les LDL-phospholipides et le LDL-cholestérol. La simvastatine augmente le HDL-cholestérol.
- La simvastatine est plus efficace pour baisser l'apoE, alors que le fénofibrate augmente significativement l'apoA-I (résultats que nous ne retrouvons pas dans notre étude).
- Les LpE:B et LpC-III:B sont très significativement diminuées sous simvastatine et fénofibrate.

Dans les deux cas de traitement, l'effet prédominant est la stimulation de l'expression des récepteurs LDL qui entraîne une captation accrue des LDL.

Le niveau potentiel d'expression maximale du récepteur LDL ne semble pas jouer un rôle essentiel dans l'efficacité du traitement. Cependant, nous observons une diminution plus importante des lipoprotéines contenant simultanément l'apoE et l'apoB (LpE:B) chez les sujets du groupe I (récepteurs LDL normaux). Il est donc possible que, l'apoE ayant plus d'affinité pour le récepteur LDL que l'apoB, les LpE:B soient plus sensibles que les LDL à de faibles variations de l'expression des récepteurs LDL (LpB) *in vivo* (en admettant toutefois que ces observations ne sont pas faussées par des biais statistiques découlant des faibles effectifs et des différences de niveau de base de ce paramètre).

Deux études récentes (Helve et Tikkanen, 1988 ; Raveh et al., 1990) conduisent à des conclusions un peu différentes des nôtres. Ces équipes observent un profil lipidique différent au départ entre les patients hypercholestérolémiques FH et non FH. L'évolution des paramètres lipidiques sous traitement est plus favorable pour les patients non FH, surtout pour la deuxième équipe (Raveh et al., 1990). Cependant les critères de recrutement des patients sont différents des nôtres. En effet, dans les deux études, les patients non FH n'ont pas de xanthomes ni d'antécédents familiaux d'hypercholestérolémie. Dans l'étude de Raveh et al. (1990), l'activité des récepteurs LDL est étudiée sur monocytes fraîchement isolés, c'est-à-dire sans la dérégulation préalable des récepteurs LDL que nous avons mis en oeuvre dans notre étude (par une culture dans un milieu sans LDL mais avec des HDL₃).

Il n'est pas étonnant qu'avant tout traitement les sujets classés non FH dans ces deux études aient un bilan lipidique moins "à risque" avec en

particulier le cholestérol, les LDL et l'apoB en concentrations plus faibles que chez les sujets FH.

Dans notre étude nous pourrions admettre que l'appellation d'hypercholestérolémie familiale est applicable à tous nos sujets puisque tous ont des antécédents familiaux d'hypercholestérolémie et beaucoup ont des antécédents de maladies cardiovasculaires. Cependant, depuis les travaux de Brown et Goldstein (1976), cette appellation de FH est en général réservée aux sujets présentant un déficit génétique en récepteurs LDL, ce qui n'est pas le cas pour 9 de nos sujets.

Quelles hypothèses pouvons-nous émettre sur l'origine de l'hypercholestérolémie dans ce cas ?

La première hypothèse est une augmentation de la synthèse de l'apoB et/ou du cholestérol et donc une augmentation de la sécrétion des VLDL et de la production des LDL. Cependant, même si une réponse définitive ne pourrait être donnée que par des études métaboliques, le bilan lipidique ne laisse apparaître aucune augmentation particulière des lipoprotéines de très basse densité (VLDL), des triglycérides, des apos E et C-III chez ces 9 patients.

La deuxième hypothèse serait un défaut des LDL qui entrainerait une diminution de leur captation par les récepteurs LDL. Malheureusement la présence ou l'absence de la mutation 3500 (Weisgraber et al., 1988) n'a pu être vérifiée chez ces patients. Toutefois la proportion de nos sujets à expression normale des récepteurs LDL semble très élevée dans notre étude (9/41) par rapport aux fréquences publiées de cette mutation parmi les hypercholestérolémies essentielles. Il semble donc peu probable que cela puisse expliquer tous les cas.

La troisième hypothèse serait une répression du récepteur LDL *in vivo* chez ces patients du groupe I (récepteurs normaux) beaucoup plus importante que chez des sujets normaux.

Dans la littérature de nombreux facteurs physiologiques (hormones par exemple), impliqués dans la régulation de l'expression des récepteurs LDL en relation ou non avec les variations du pool intracellulaire de cholestérol, ont été décrits. Il est possible que chez nos sujets un dérèglement génétique ou acquis de ces processus de régulation conduise à une répression

anormale des récepteurs LDL *in vivo* et aboutisse à une hypercholestérolémie présentant tous les risques d'une FH.

Une telle répression générale des récepteurs LDL *in vivo* a été avancée pour expliquer l'augmentation du cholestérol et des LDL avec l'âge et chez les femmes après la ménopause. Il s'agit là d'une diminution acquise de l'expression du récepteur LDL.

Il est fort probable que l'étude approfondie des éléments régulateurs du gène du récepteur LDL et des effecteurs agissant au niveau de ces éléments permettront, dans l'avenir, de préciser ces hypothèses.

II. FAMILLES SELECTIONNEES DONT UN ENFANT EST HYPERCHOLESTEROLEMIQUE

La collaboration avec le Professeur FARRIAUX du Centre Hospitalier Régional de Lille nous a permis d'étudier des familles dont un enfant au moins présente les signes cliniques d'une Hypercholestérolémie Familiale (FH). Un parent au moins présente aussi une altération de son bilan lipidique.

Notre travail a consisté à déterminer le bilan complet en lipides, lipoprotéines et apolipoprotéines. Nous avons étudié l'expression du récepteur LDL des lymphocytes et des fibroblastes de chacun des sujets de cinq familles.

Notre but était de sélectionner une famille particulière dont l'hypercholestérolémie ne serait pas liée exclusivement à un défaut de récepteur LDL.

Pour les cinq familles nous avons donc aussi vérifié que les LDL des sujets étaient de bons ligands pour le récepteur LDL. Pour une des familles, l'hypothèse d'un défaut du ligand ne peut être rejetée. Le cas de cette famille sera traité dans la troisième partie de ce chapitre.

II.1. Matériels et méthodes

II.1.1. Les Familles

Les familles que nous avons observées ont d'abord été choisies sur la base du bilan lipidique de l'enfant suivi à la Clinique Pédiatrique et du parent suspecté de lui avoir transmis la maladie.

Nous avons réalisé le dosage de l'activité des récepteurs LDL des lymphocytes des sujets hypercholestérolémiques de dix familles.

Dans cinq familles, l'étude a été étendue à tous les membres de la famille (frère ou soeur et parents de l'enfant malade).

Les résultats préliminaires (bilan lipidique et dosage du récepteur LDL sur lymphocytes) nous avaient amenés à classer les familles dans trois groupes (Delattre, 1988) :

1 enfant et 1 parent hétérozygotes FH

- famille K.,
- famille C.,
- famille S.

1 enfant hétérozygote et 1 parent intermédiaire entre normal et hétérozygote FH

- famille R.

enfants normaux et 1 parent normal

- famille M.

Cette dernière famille (famille M) sera étudiée dans la troisième partie de ce chapitre.

II.1.2. Les bilans

Pour chaque sujet, un bilan lipidique complet a été réalisé :

- lipides dosés par méthode enzymatique,
- apolipoprotéines dosées par néphélométrie ou par des méthodes immunoenzymatiques,
- lipoprotéines dosées par des méthodes immunoélectrophorétiques ou immunoenzymatiques.

II.1.3. Le dosage de l'activité du récepteur LDL

a. Sur les lymphocytes

L'activité du récepteur LDL des lymphocytes est dosée par la technique d'immunofluorescence indirecte (cf Chapitre II III. - Fiche technique n°12).

b. Sur les fibroblastes

L'activité du récepteur LDL des fibroblastes est dosée par la technique de radioligand utilisant les ^{125}I -LDL (cf Chapitre II II. - Fiche technique n°11). Les premières expérimentations sont réalisées avec une concentration fixe de ^{125}I -LDL (10 $\mu\text{g/ml}$). D'autres déterminations ont pu être réalisées avec une gamme de concentrations croissantes de ^{125}I -LDL (1 à 25 $\mu\text{g/ml}$).

II.1.4. La fixation des LDL des sujets sur les cellules HeLa

Nous avons vu dans le chapitre II I. que les cellules HeLa expriment un récepteur LDL normal à leur surface. Elles sont particulièrement adaptées à l'étude des ligands du récepteur LDL. Nous les avons utilisées pour vérifier que les LDL des sujets étudiés avaient une fixation identique à celles de LDL isolées à partir du plasma de sujets normolipémiques.

Les LDL de chaque patient ont été isolées à partir de 15 ml de plasma par ultracentrifugation séquentielle aux densités 1,030 et 1,053. Des LDL témoins ont été isolées dans les mêmes conditions à partir du plasma d'un sujet normolipémique (Fiche technique n°1).

Des LDL normales ont été marquées à l'Iode ^{125}I .

Des cellules HeLa, préincubées 48 heures en milieu DMEM contenant 10% de LPDS, sont incubées pendant 2 heures à 4°C avec 0,7 ml de DMEM/LPDS contenant :

- une concentration fixe de ^{125}I -LDL (10 $\mu\text{g/ml}$),
- et une concentration croissante de LDL non marquées (0 à 100 $\mu\text{g/ml}$).

Les ^{125}I -LDL se fixant aux cellules par le récepteur LDL spécifique, les LDL non marquées entrent en compétition. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fixation totale des ^{125}I -LDL sans LDL non marquées.

Les courbes de compétition sont comparées avec la courbe de compétition des LDL témoins.

II.2. Résultats

II.2.1. La Famille K.

S. K. est né le 21 juin 1974. Il est suivi depuis 12 ans par le Pr. Farriaux pour une hypercholestérolémie. Il bénéficie d'un traitement par le Questran (résine séquestrante) associé aux mesures diététiques. Les résultats de cette thérapeutique ont permis de stabiliser le cholestérol plasmatique à 2,5 g/l environ.

Concentration plasmatique g/l	S. K. Questran		Mère	Père	
Cholestérol	2,58	2,42	2,41	4,54	3,97
Chol-HDL	0,35	0,29	0,59	0,49	0,3
Triglycérides	1,34	0,98	1,08	2,14	1,93
Phospholipides	2,25	2,08	2,51	3,7	3,34
P-HDL	0,84	0,56	1,37	1,22	0,79
Chol. non lié à l'apoB	-	-	0,55	0,44	-
P. non liés à l'apoB	-	-	1,32	0,99	-
apoA-I	-	1,27	-	-	1,61
apoB	-	1,87	-	-	3,49
apoA-II	0,23	0,29	0,52	0,45	0,36
apoE	0,071	0,088	0,039	0,11	0,075
apoC-III	0,026	0,036	0,021	0,049	0,039
LpA-II:A-I	0,82	1,5	-	1,04	1,44
LpC-III:B	0,11	0,25	-	0,37	0,79
LpE:B	0,56	1,07	0,36	-	0,53
Lp(a):B	0,281	0,351	0,19	0,009	0,008

Tableau VII : Bilan lipidique, lipoprotéinique et apolipoprotéinique des sujets de la famille K.

Deux prélèvements ont été réalisés à 6 mois d'intervalle (sauf pour la mère) pour avoir le bilan le plus complet possible.

P. : phospholipides

Chol. : cholestérol

Sa mère a un bilan normal alors que son père présente une cholestérolémie élevée. Nous n'observons pas d'hypertriglycéridémie (Tableau VII).

Les LDL des trois membres de cette famille ont la même capacité que les LDL normales à entrer en compétition avec des ^{125}I -LDL à 10 $\mu\text{g/ml}$ sur le récepteur LDL des cellules HeLa (Figure 2).

L'activité des récepteurs LDL à 4°C des lymphocytes est normale chez la mère, mais déficiente chez S. K. et son père.

Le dosage du récepteur LDL des fibroblastes est résumé dans le tableau VIII (moyenne de 2 expérimentations). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité des récepteurs LDL de fibroblastes normaux incubés en présence de ^{125}I -LDL à 10 $\mu\text{g/ml}$.

S. présente une activité du récepteur LDL presque diminuée de moitié par rapport au témoin normal.

Son père a une fixation à 4°C et une fixation-internalisation à 37°C déficientes. La dégradation à 37°C semble normale.

Sa mère a des résultats plus forts que les fibroblastes témoins.

Ces résultats confirment les données obtenues sur lymphocytes.

L'activité des récepteurs LDL de S. K. est diminuée de moitié. Son hypercholestérolémie est de type familial, elle est transmise par son père. C'est surtout la fixation des LDL qui est déficiente, la dégradation semble normale.

II.2.2. La Famille C.

J. C. est née le 8 mai 1985. Vu son jeune âge, le seul traitement actuel est diététique. Cela ne semble pas suffisant car la cholestérolémie est supérieure à 3 g/l. Ses deux parents sont hypercholestérolémiques (Tableau IX).

Sur les cellules HeLa incubées avec 10 μg ^{125}I -LDL/ml, les LDL de ces sujets entrent en compétition dans les mêmes proportions que des LDL normales.

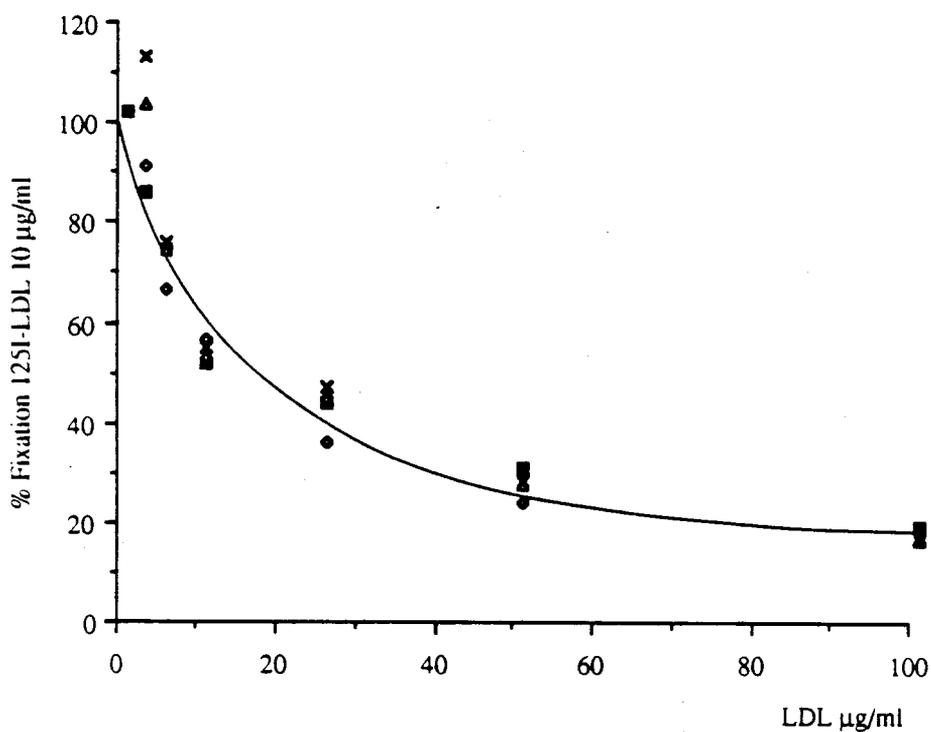


Figure 2 : Courbes de compétition des LDL de la famille K. avec des ^{125}I -LDL à 10 $\mu\text{g/ml}$ sur les cellules HeLa.

Les cellules HeLa sont incubées pendant 2 heures à 4°C avec 10 μg ^{125}I -LDL/ml et une gamme de concentrations croissantes de LDL non marquées. Les courbes sont comparées à celle obtenue avec des LDL normales.

- LDL normales
- ◆ LDL de S.
- ▲ LDL de la mère
- × LDL du père

	Fixation à 4°C	Fixation-internalisation à 37°C	Dégradation à 37°C
S. K.	66%	50%	68%
Mère	121%	226%	141%
Père	39%	52%	165%

Tableau VIII : Activité des récepteurs LDL des fibroblastes des sujets de la famille K.

Les fibroblastes sont incubés pendant 2 heures à 4°C ou 4 heures à 37°C avec 10 µg ¹²⁵I-LDL/ml.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité des récepteurs LDL de fibroblastes normaux étudiés en même temps.

Concentration plasmatique g/l	J. C. Régime	Mère	Père
cholestérol	3,14	2,92	2,51
HDL-cholestérol	0,38	0,42	0,49
Triglycérides	0,66	0,88	0,83
Phospholipides	2,67	2,8	2,65
P-HDL	0,77	1,08	1,22
Cholestérol-VLDL	0,14	0,1	0,18
Cholestérol-LDL	2,62	2,4	1,84
Chol. non lié à l'apoB	0,33	0,44	0,44
P. non liés à l'apoB	0,88	1,21	1,21
apoA-I	1,12	1,26	1,47
apoB	1,63	1,7	1,4
apoA-II	0,27	0,25	0,27
apoE	0,053	0,062	0,01
apoC-III	0,016	0,028	0,018
LpA-II:A-I	0,58	0,75	0,64
LpC-III:B	0,13	0,12	0,07
LpE:B	0,16	0,07	0,15
Lp(a):B	0,01	0,15	0
BL3	3,1	3,11	3,51
BL5	0,59	0,55	0,5
BL7	2,39	1,92	2,15
LpA-I	0,43	0,46	0,47

Tableau IX : Bilan lipidique, lipoprotéinique et apolipoprotéinique des sujets de la famille C.

P. : phospholipides

Chol. : cholestérol

L'hypercholestérolémie du père n'est pas due à un déficit en récepteurs LDL, car les résultats sont normaux sur lymphocytes.

La détermination de l'activité des récepteurs LDL par immunofluorescence indirecte à 4°C montre que les lymphocytes de J. C. et de sa mère présentent une déficience équivalente à un hétérozygote FH confirmé.

Les premiers résultats d'expérimentation sur fibroblastes nous ont amenés à revoir notre méthode de dosage de l'activité des récepteurs LDL (incubation des fibroblastes avec une concentration fixe de ^{125}I -LDL). En incubant les fibroblastes avec des ^{125}I -LDL à 10 µg/ml, l'activité des récepteurs LDL était normale pour les trois membres de cette famille (sauf à 37°C où elle est diminuée de moitié pour la mère).

Les fibroblastes de J. C. ont donc été une nouvelle fois comparés avec des fibroblastes normaux mais avec :

- une même densité cellulaire d'ensemencement,
- une gamme de concentrations croissantes de ^{125}I -LDL.

Les résultats obtenus (Figure 3) confirment une déficience des récepteurs LDL chez cet enfant.

L'hypercholestérolémie de J. C. est de type familial. Elle est transmise par sa mère.

Son père présente une hypercholestérolémie non liée au récepteur LDL.

II.2.3. La Famille S.

S. S. est né le 4 mai 1975. Il est issu d'une famille souffrant d'hypercholestérolémie. Son père et son grand-père paternel sont hypercholestérolémiques et un oncle paternel est décédé d'un infarctus du myocarde à l'âge de 41 ans. Sa mère n'est pas atteinte (Tableau X).

Les LDL de ces trois sujets se fixent de façon normale aux cellules HeLa.

Le bilan lipidique est confirmé par le dosage du récepteur LDL sur lymphocytes par immunofluorimétrie indirecte à 4°C. Les lymphocytes sont normaux pour la maman, alors que pour S. S. et son

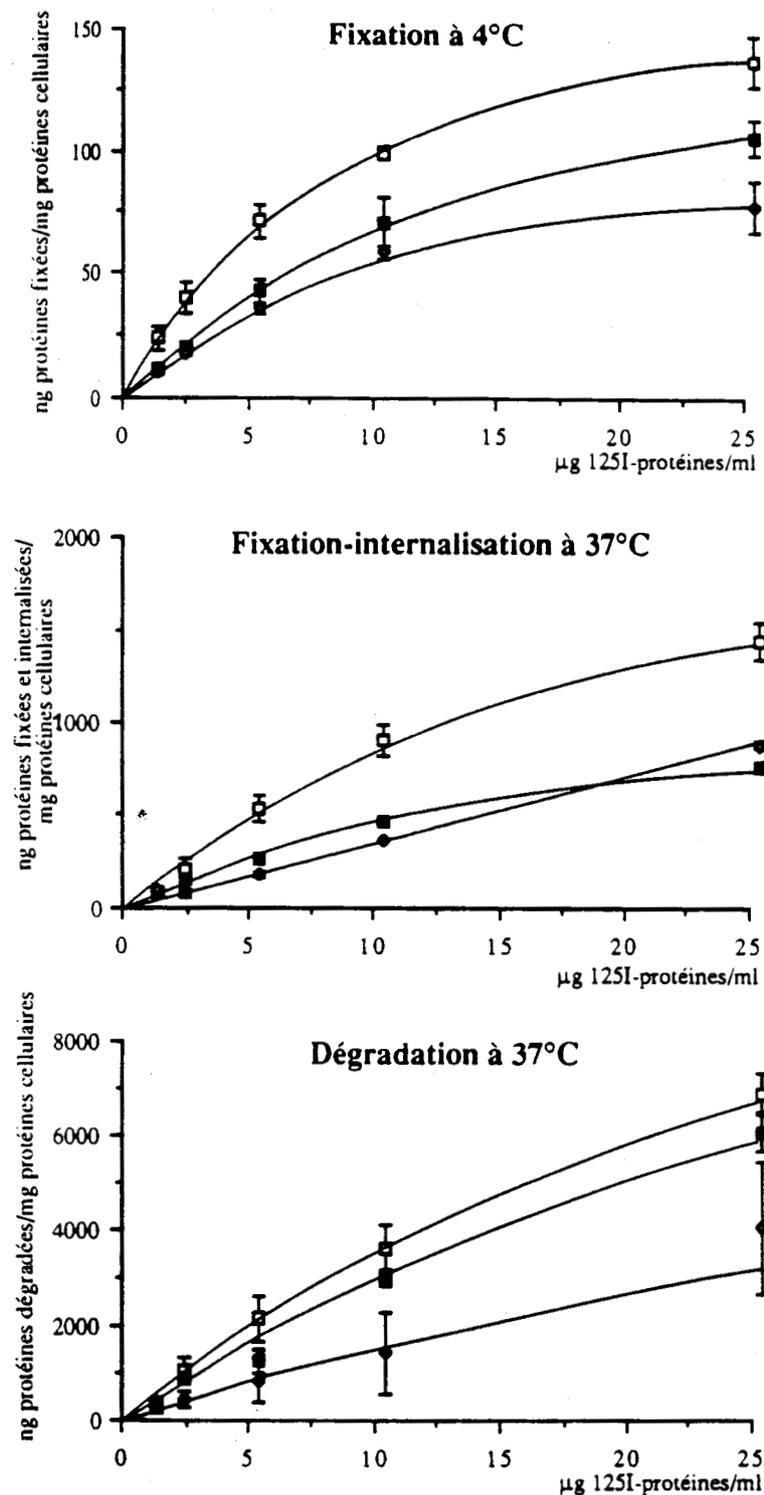


Figure 3 : Etude de la fixation à 4°C, de la fixation-internalisation et de la dégradation à 37°C des ^{125}I -LDL par les fibroblastes de J. C.

Les fibroblastes des différentes souches ont été ensemencés avec une même densité cellulaire puis préincubés pendant 48 heures en DMEM/LPDS. Ils sont incubés en présence d'une gamme de concentrations croissantes de ^{125}I -LDL pendant 2 heures à 4°C ou 4 heures à 37°C.

- P., fibroblastes normaux
- Z., fibroblastes hétérozygotes FH
- fibroblastes de J. C.

Concentration plasmatique g/l	S. S. Régime	Mère	Père
cholestérol	3,06	1,74	2,73
HDL-cholestérol	0,46	0,6	0,53
Triglycérides	0,95	0,54	0,79
Phospholipides	2,73	2,17	2,73
P-HDL	1,33	1,4	1,4
Chol. non lié à l'apoB	0,44	0,66	0,66
P. non liés à l'apoB	1,1	1,43	1,43
apoA-I	1,26	1,63	1,79
apoB	1,67	0,62	1,45
apoA-II	0,22	0,2	0,31
apoE	0,057	0,035	0,06
apoC-III	0,02	0,01	0,011
LpA-II:A-I	0,5	0,52	1,02
LpC-III:B	0,11	0,08	0,09
LpE:B	0,18	0,09	0,1
Lp(a):B	0,1	0	0,06
BL3	3,29	1,18	2,85
BL5	0,43	0,2	0,45
BL7	1,97	1,11	1,05
LpA-I	0,36	0,67	0,35

Tableau X : Bilan lipidique, lipoprotéinique et apolipoprotéinique des sujets de la famille S.

P. : phospholipides

Chol. : cholestérol

père, nous détectons une déficience des récepteurs LDL sur lymphocytes.

Alors que le père présente 50% de l'activité normale des récepteurs LDL à 4°C, les fibroblastes de S. S. ont une activité normale des récepteurs LDL. Les fibroblastes de sa mère sont normaux. Donc comme pour la famille C., les premières expériences sur fibroblastes avec 10 µg ¹²⁵I-LDL/ml donnent des résultats contradictoires avec ceux obtenus sur lymphocytes.

Cette discordance nous avait amenés à émettre l'hypothèse d'un problème de régulation du récepteur LDL pour S. S.. Les lymphocytes préincubés en RPMI/SAB et HDL₃ à 300 µg/ml étant déficients, nous avons pensé que, dans ces conditions, le récepteur LDL n'était peut-être pas stimuable. Les tests sur lymphocytes nécessitant une nouvelle prise de sang et l'étude de la sensibilité aux HDL₃ (étude de l'efflux de cholestérol) demandant un nombre important de cellules, nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse. Cependant, en contrôlant les fibroblastes avec une gamme de ¹²⁵I-LDL et une même densité cellulaire d'ensemencement que les fibroblastes témoins normaux et hétérozygotes FH, une activité réduite du récepteur LDL pour S. S. a été montrée après incubation des cellules en DMEM/LPDS (Figure 4).

Ces expérimentations confirment donc tout à fait l'importance de grandes précautions lors d'un diagnostic.

S. S. souffre d'une hypercholestérolémie de type familial par déficit en récepteurs, bien que l'activité à 37°C ne soit diminuée que de 25% par rapport à des fibroblastes normaux. La maladie est transmise par son père.

II.2.4. La Famille R.

H. R. est né le 19 mai 1966. Comme sa mère, il est hypercholestérolémique. Au moment du bilan, les seules mesures prises pour baisser la cholestérolémie sont diététiques. Son père présente un bilan lipidique normal (Tableau XI).

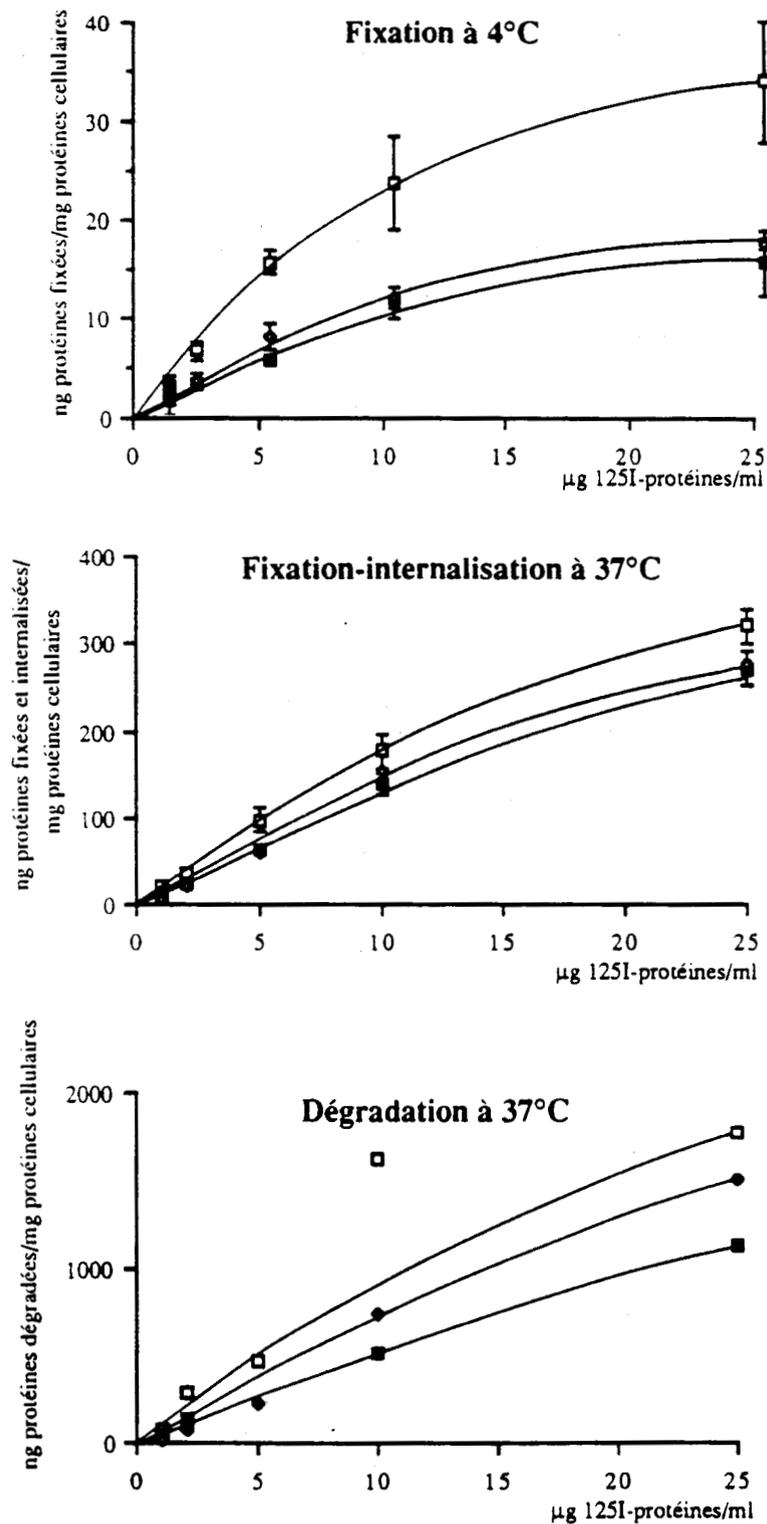


Figure 4 : Etude de la fixation à 4°C, de la fixation-internalisation et de la dégradation à 37°C des ^{125}I -LDL par les fibroblastes de S. S.

Les fibroblastes des différentes souches ont été ensemencés avec une même densité cellulaire puis préincubés pendant 48 heures au DMEM/LPDS. Ils sont incubés en présence d'une gamme de concentrations croissantes de ^{125}I -LDL pendant 2 heures à 4°C ou 4 heures à 37°C.

- V., fibroblastes normaux
- Z., fibroblastes hétérozygotes FH
- fibroblastes de S. S.

Concentration plasmatique g/l	H. R. Régime	Mère	Père
cholestérol	3,27	3,76	1,89
HDL-cholestérol	0,42	0,56	0,49
Triglycérides	0,8	1,05	0,98
TG-HDL	0,31	0,21	0,14
Phospholipides	2,71	3,24	2,19
P-HDL	0,87	1,12	1,01
Cholestérol-VLDL	0,2	0,4	0,19
Cholestérol-LDL	2,65	2,8	1,21
P-VLDL	0,22	0,36	0,22
TG-VLDL	0,24	-	0,32
Chol. non lié à l'apoB	0,4	0,55	0,44
apoA-I	1,28	1,64	1,48
apoB	1,86	1,96	1,33
apoE	0,072	0,065	0,062
apoC-III	0,025	0,026	0,039
LpA-II:A-I	0,61	0,63	1,19
LpC-III:B	0,11	0,15	0,1
LpE:B	0,07	0,16	0,59
Lp(a):B	0,44	0	0,35
BL3	3,05	2,69	2,43
BL5	-	0,45	0,19
BL7	2,83	2,37	1,53
LpA-I	0,29	0,55	0,33

Tableau XI : Bilan lipidique, lipoprotéinique et apolipoprotéinique des sujets de la famille R.

TG : Triglycérides

P. : phospholipides

Chol. : cholestérol

Leurs LDL entrent en compétition, dans les mêmes proportions que les LDL témoins normales, pour la fixation des ^{125}I -LDL à 10 $\mu\text{g/ml}$ sur les cellules HeLa.

Les résultats obtenus sur les lymphocytes et les fibroblastes sont résumés dans le tableau XII. Les résultats sont donnés en pourcentage de l'activité des récepteurs LDL de cellules normales. Les lymphocytes sont testés en immunocytofluorimétrie indirecte. Les fibroblastes sont incubés avec une concentration fixe (10 $\mu\text{g/ml}$) de ^{125}I -LDL.

La mère de H. H. présente des résultats intermédiaires entre le phénotype normal et le phénotype hétérozygote FH.

Les lymphocytes et fibroblastes de son père ont une activité encore plus importante que les cellules normales témoins.

H. H. présente des résultats réduits de moitié par rapport à la souche normale.

L'hypercholestérolémie dont souffre H. R. est de type familial. Elle est transmise par sa mère qui présente des résultats intermédiaires entre normal et hétérozygote FH.

II.3. Conclusion

Les quatre familles étudiées précédemment sont donc atteintes d'hypercholestérolémie familiale liée à un défaut du récepteur LDL (Tableau XIII).

Les résultats présentés montrent l'importance de l'étude du récepteur LDL sur différents types cellulaires. Les expérimentations et leurs résultats nous ont permis d'optimiser les méthodes.

Les méthodes de dosage du récepteur LDL sur cellules sont lourdes à mettre en place (biopsie de peau, prélèvement de sang, culture des cellules, utilisation de radioéléments). Elles permettent cependant un diagnostic fiable quand elles sont réalisées sur les fibroblastes et les lymphocytes, avec un protocole bien standardisé comme il a été établi dans notre laboratoire. Elles permettent de confirmer le diagnostic clinique.

	Lymphocytes cytofluorimétrie indirecte 4°C	Fibroblastes		
		Fixation 4°C	fix-intern. 37°C	Dégradation 37°C
H. R.	50%	40%	40%	47%
Mère	75%	65%	46%	84%
Père	100%	136%	186%	184%

Tableau XII : Activité des récepteurs LDL des lymphocytes et des fibroblastes des sujets de la famille R.

Les lymphocytes sont étudiés en immunocytofluorimétrie à 4°C.

Les fibroblastes sont incubés pendant 2 heures à 4°C ou 4 heures à 37°C avec 10 µg ¹²⁵I-LDL/ml.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité récepteur LDL des cellules normales de référence.

fix-intern. : étude de la fixation-internalisation des LDL à 37°C.

	LDL	Activité des récepteurs LDL des lymphocytes	Activité des récepteurs LDL des fibroblastes			conclusion Activité des récepteurs LDL
			Fixation 4°C	Fix - intern. 37°C	Dégradation 37°C	
Famille K. S. Mère Père	normales normales normales	déficiente normale déficiente	déficiente > normale déficiente	déficiente > normale déficiente	déficiente > normale > normale	déficiente normale F. + I. déficientes
Famille C. J. Mère Père	normales normales normales	déficiente déficiente normale	déficiente normale normale	déficiente déficiente normale	déficiente déficiente normale	déficiente déficiente normale
Famille S. S. Mère Père	normales normales normales	déficiente normale déficiente	déficiente normale déficiente	intermédiaire normale déficiente	intermédiaire normale déficiente	fix. déficiente normale déficiente
Famille R. H. Mère Père	normales normales normales	déficiente déficiente normale	déficiente déficiente > normale	déficiente déficiente > normale	déficiente intermédiaire > normale	déficiente F. + I. déficientes normale

Tableau XIII : Tableau récapitulatif de l'étude des LDL et de l'activité des récepteurs LDL des lymphocytes et des fibroblastes dans quatre familles.

Les LDL sont étudiées par une compétition avec des ¹²⁵I-LDL sur les cellules HeLa. Les lymphocytes sont étudiés en immunocytofluorimétrie indirecte.

Les fibroblastes sont étudiés par une technique de radioligand. Les résultats sont comparés à l'activité récepteur LDL des cellules normales de référence.

F + I : Fixation à 4°C et fixation-internalisation à 37°C

fix : fixation à 4°C

Instaurés dans des familles à haut risque (antécédents familiaux), ces types de dosage réalisés d'abord chez les parents permettent le suivi des enfants dès leur plus jeune âge.

Les résultats discordants que nous avons pu observer pour certains sujets selon le type cellulaire a été élucidée par la standardisation de nos méthodes. Cependant, il n'est pas à exclure que, chez certains sujets, les cellules soient plus sensibles à la stimulation du récepteur LDL par des facteurs extérieurs (confluence ou densité cellulaire plus ou moins importante, milieu DMEM/BSA, HDL₃, milieu DMEM/LPDS qui peut varier selon le lot de LPDS, ...).

La caractérisation récente des mutations au niveau du gène du récepteur LDL (techniques diverses de biologie moléculaire), avait laissé espérer un diagnostic sur simple prise de sang et analyse du DNA par RFLP (étude des fragments de restriction) ou hybridation du DNA amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction). Cependant, la multiplicité des mutations ne permettent pas d'imaginer un dépistage rapide et exhaustif. Une recherche systématique ne peut être possible que dans une population où il existe un effet fondateur (mutation des Canadiens français (Hobbs et al., 1987 ; Leitersdorf et al., 1990), des Afrikaners (Leitersdorf et al., 1989b)).

III. CAS PARTICULIER DE LA FAMILLE M.

Dans le cadre de la collaboration avec le Professeur Farriaux de la Clinique Pédiatrique du Centre Hospitalier de Lille, nous avons étudié 5 familles (un enfant et ses deux parents). Une famille s'est rapidement démarquée des quatre autres (étudiées dans le chapitre III II.). En effet, les LDL des sujets de la famille M. étaient moins bien reconnues par les récepteurs LDL cellulaires.

C'est cette famille que nous nous proposons d'étudier dans cette troisième partie.

III.1. Matériels et méthodes

III.1.1. Les sujets de la famille M.

M. M. est née le 24 septembre 1975. A 8 ans, à la suite d'un bilan lipidique prescrit à cause de céphalées fréquentes, une cholestérolémie à 3,82 g/l lui est découverte. Depuis 1986, elle est suivie en consultation chez le Professeur Farriaux. Depuis novembre 1987, elle est traitée au Questran.

Un bilan systématique chez sa soeur A., née le 24 juillet 1978 révèle une hypercholestérolémie modérée à 2,20 g/l. A ce jour, elle est sans traitement.

Chez leur mère le Zocor (Simvastatine) ne baisse pas la cholestérolémie qui reste à 4 g/l. A ce jour et depuis 1989, leur mère est traitée au Lipanor (Fibrate).

Des conseils diététiques ont bien sûr été donnés à la famille.

III.1.2. Les bilans

Les derniers bilans ont été réalisés en juillet 1990 (Tableau XIV).

A. M. présente une cholestérolémie normale à 1,94 g/l. Elle présente comme son père une triglycéridémie élevée (2,02 g/l et 1,89 g/l respectivement). Ce dernier a une cholestérolémie élevée à 2,41 g/l.

Concentration plasmatique g/l	M. M. Questran	A. M.	Mère Lipanor	Père
cholestérol	2,57	1,94	2,36	2,41
HDL-cholestérol	0,66	0,46	0,46	0,28
Triglycérides	1,63	2,02	1,08	1,89
Phospholipides	2,84	2,33	2,5	2,43
P-HDL	1,43	1,15	1,12	0,8
Cholestérol-VLDL	0,24	0,28	0,16	0,35
Cholestérol-LDL	1,58	1,08	1,68	1,75
Chol. non lié à l'apoB	0,77	0,55	0,55	0,33
P. non liés à l'apoB	1,76	1,43	1,43	0,99
apoA-I	1,88	1,59	1,52	1,08
apoB	1,27	1,07	1,3	1,59
apoA-II	0,33	0,32	0,29	0,29
apoE	0,046	0,051	0,042	0,033
apoC-III	0,036	0,039	0,025	0,03
LpA-II:A-I	0,59	0,5	0,58	0,55
LpC-III:B	0,19	0,24	0,14	0,28
LpE:B	0,26	0,35	0,44	0,48
Lp(a):B	0,1	0,1	0	0,04
BL3	-	1,41	1,98	-
BL5	-	0,26	0,37	-
BL7	-	1,46	1,79	-
LpA-I	0,72	0,52	0,61	0,34

Tableau XIV : Bilan lipidique, lipoprotéinique et apolipoprotéinique des sujets de la famille M.

P. : phospholipides

Chol. : cholestérol

M. M. et sa mère présentent une hypercholestérolémie (2,57 g/l et 2,96 g/l respectivement) sans élévation des triglycérides et ceci malgré le traitement.

III.1.3. Le dosage de l'activité des récepteurs LDL

L'activité des récepteurs LDL a été déterminée dans un premier temps par immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C sur lymphocytes. Les résultats préliminaires et le bilan lipidique nous avaient fait classer cette famille dans le groupe des familles hypercholestérolémiques à activité normale des récepteurs LDL sur lymphocytes (Chapitre III II.). Une deuxième détermination a été réalisée sur les lymphocytes, en étendant l'étude au père.

Une biopsie de peau a été pratiquée chez les quatre sujets de cette famille. Nous avons dosé l'activité des récepteurs LDL sur fibroblastes :

- avec une concentration fixe de ^{125}I -LDL (10 $\mu\text{g/ml}$),
- et avec une gamme de concentrations croissantes de ^{125}I -LDL.

III.1.4. Etude des LDL de la famille M.

a. Caractérisation chimique

Les LDL sont isolées à partir de 15 ml de plasma de chaque sujet entre les densités 1,030 et 1,053 par ultracentrifugation séquentielle (Fiche technique n°1).

Le cholestérol total, le cholestérol non estérifié, les triglycérides et les phospholipides ont été dosés sur ces fractions par les kits Boehringer. Les protéines totales sont dosées par la méthode de Petersen (1977). Ces quatre fractions sont comparées à deux lots de LDL isolées chez des sujets normaux.

Les fractions sont soumises à une électrophorèse dénaturante SDS-PAGE, en gradient continu de polyacrylamide 3,75-15%. Les fractions migrent dans un gel de 8,0 cm x 7,0 cm et de 15 mm d'épaisseur dans un système minicuve Hoeffer en tampon Tris 25 mM - glycine 192 mM - SDS 0,1% pH 8,3, sous une tension de 150 V pendant 45 minutes.

b. Etude sur cellules HeLa et fibroblastes

Nous étudions l'interaction des LDL des sujets de la famille M. sur les récepteurs des cellules HeLa et des fibroblastes normaux. Les cellules sont incubées à 4°C ou à 37°C avec une concentration fixe de ^{125}I -LDL (10 µg/ml) et une gamme de concentrations croissantes de LDL à tester (0 à 100 µg/ml).

Chaque essai sur les cellules HeLa a été réalisé quatre fois, en double, sur trois lots de LDL, à 18 mois d'intervalle. Un test de Mann et Withney a été appliqué pour l'étude statistique.

Sur les fibroblastes, chaque essai a été réalisé deux fois, en double, sur un même lot de LDL.

c. Etude sur les cellules U937

Frostegard et al. (1990a) ont récemment mis au point une méthode d'étude des LDL sur les cellules U937. Ces cellules ne synthétisent pas le cholestérol (cf. Chapitre II V.1.1.). Leur croissance dépend totalement du cholestérol exogène apporté par les LDL. Elle peut donc être ralentie si les LDL additionnées au milieu de culture ne sont pas de bons ligands pour le récepteur LDL.

Du plasma des sujets de la famille M. a été envoyé à cette équipe Suédoise qui a testé, dans son système, les LDL de nos malades. Les LDL sont rajoutées à un milieu de culture dépourvu de lipoprotéines et de stérols. La croissance cellulaire est évaluée par numération.

d. Technique radio-immunologique

L'accessibilité de différents épitopes de l'apoB des LDL est étudiée par une technique radio-immunologique utilisant différents anticorps monoclonaux et mettant en compétition des ^{125}I -LDL normales et les LDL à étudier (Fievet et al., 1989 ; Pease et al., 1990). Sept anticorps monoclonaux de rats ou de souris, reconnaissant différents épitopes de l'apoB, sont utilisés (Tableau XV ; Figure 5).

Les anticorps monoclonaux sont adsorbés sur une plaque de microtitration. Différentes dilutions de LDL non marquées sont incubées pendant une nuit à température ambiante avec une concentration fixe de LDL natives marquées à l'Iode ^{125}I .

Après lavage, la radioactivité associée à chaque puits est comptée : B.

Chaque lot de LDL est testé en triple.

Anticorps monoclonal	Origine	Epitope reconnu Position des acides aminés (AA)
B1	rat	AA : 128-689
B4	rat	AA : 1854-1878 (jonction B48-B100)
DA7	rat	Région Nterminale de la zone de fixation au récepteur LDL
BA11	rat	Compétition avec 3 anticorps (3A8, 3A10, 5E11) dont l'épitope est AA ≈ 3506 (zone récepteur)
BL3	souris	AA ≈ 4355
BL5	souris	Reconnaissance conformationnelle
BL7	souris	AA ≈ 2331

Tableau XV : Epitopes de l'apolipoprotéine B reconnus par différents anticorps monoclonaux de rat ou de souris.

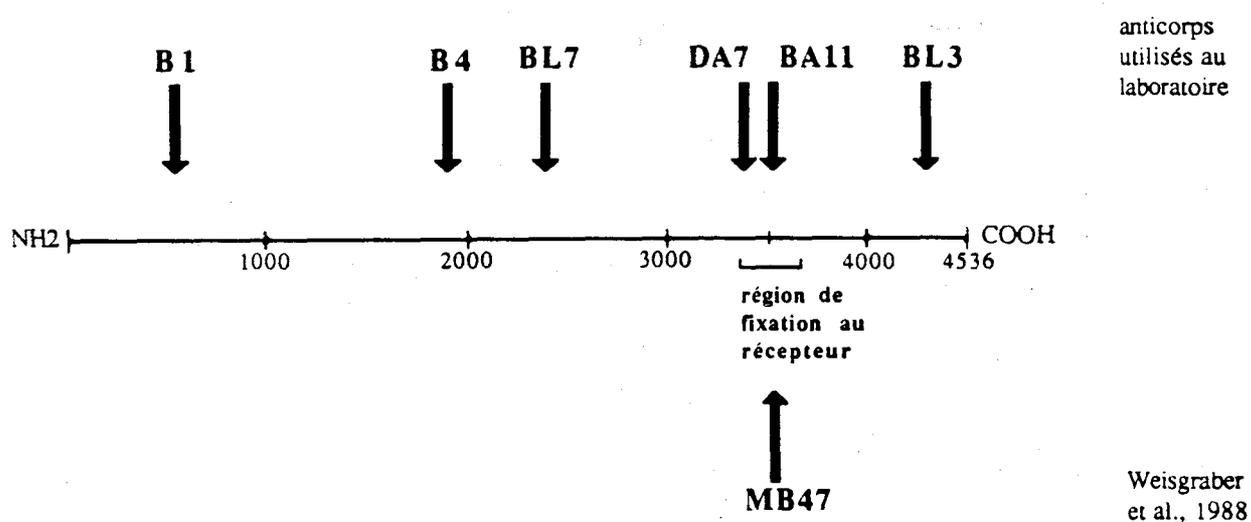


Figure 5 : Carte linéaire de l'apolipoprotéine B.

Les flèches montrent la position d'épitopes reconnus par quelques anticorps monoclonaux de rat ou de souris.

Les puits incubés avec les ^{125}I -LDL sans LDL compétiteur permettent de déterminer B_0 , la fixation maximale des ^{125}I -LDL à l'anticorps monoclonal.

La courbe moyenne [$B/B_0 = f(\log \text{ concentration LDL})$] est tracée pour chaque lot de LDL, puis comparée avec celle des LDL normales témoins. Nous pouvons ainsi déterminer, pour chaque lot de LDL par rapport aux LDL témoins natives, la quantité de LDL nécessaire au déplacement de 50% des ^{125}I -LDL qui reflète l'expression de l'épitope de l'anticorps monoclonal correspondant.

Le dosage des épitopes des LDL testées de la famille M. est exprimé en pourcentage par rapport aux LDL témoins (auxquelles on attribue 100%). Si la valeur est supérieure à 100% cela signifie que l'accessibilité des épitopes des LDL étudiées est diminuée par rapport aux LDL normales de référence car il faudra une plus grande quantité de LDL étudiées pour inhiber la fixation des LDL marquées. Des analyses statistiques (test t de Student, analyse de Variance, test t de comparaison multiple) ont été réalisées sur les résultats de dosage des épitopes.

Après régression linéaire de la courbe B/B_0 (= logit B/B_0), nous pouvons déterminer l'affinité apparente des épitopes vis-à-vis des anticorps monoclonaux.

L'affinité apparente est donnée par la pente de la droite de régression, et comparée à l'affinité apparente de LDL normales témoins traitées en même temps. Elle est exprimée en unités arbitraires.

e. Détection de la mutation 3500

La mutation 3500 se caractérise par la mutation d'une guanosine (G) en adénosine (A) à la position 10699 dans l'exon 26 du gène de l'apoB, conduisant à la substitution d'une arginine par une glutamine en position 3500 de la séquence protéique.

Une région de 800 paires de bases entourant la paire de base 10699 est amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Après transfert sur membrane de nitrocellulose, la présence de la mutation est testée par hybridation avec deux oligonucléotides. L'un est spécifique de l'allèle normal, l'autre est spécifique de l'allèle muté.

La révélation de l'hybridation se fait par autoradiographie.

III.2. Résultats

III.2.1. Activité des récepteurs LDL cellulaires

a. Activité des récepteurs LDL des lymphocytes

Les expérimentations préliminaires réalisées sur les lymphocytes de M. M., A. M. et de leur mère nous avaient amenés à classer cette famille dans les hypercholestérolémies à activité normale des récepteurs LDL.

Un deuxième prélèvement réalisé 1 an après nous faisait revoir notre classification.

Par immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C, les lymphocytes de M. M., A. M. et de leur mère fixent moins les LDL que les lymphocytes isolés du sang d'un sujet normal témoin. La déficience n'est cependant pas aussi marquée que dans le cas de l'hypercholestérolémie familiale hétérozygote.

L'activité des récepteurs LDL des lymphocytes de leur père est normale.

b. Activité des récepteurs LDL des fibroblastes

L'activité des récepteurs LDL des fibroblastes des sujets de la famille M. est reportée dans le tableau XVI.

Ces résultats sont confirmés par l'étude avec une gamme de concentration croissante de ^{125}I -LDL et une même densité cellulaire d'ensemencement (Figures 6 A, B et C). A 4°C et 37°C, les quatre membres de cette famille présentent une déficience de l'activité des récepteurs LDL.

c. Conclusion

Nous observons une déficience du récepteur LDL des lymphocytes et fibroblastes de M. M. et de sa mère.

Pour A. M., la déficience du récepteur LDL semble moins accentuée.

Les fibroblastes de leur père présente une déficience du récepteur LDL, mais pas les lymphocytes.

Il semblerait que, dans cette famille, l'expression des récepteurs LDL ne soit pas identique chez le père et la mère, et les deux filles.

De plus, A. M. et son père souffrent d'une hypercholestérolémie et d'une hypertriglycéridémie, alors que M. M. et sa mère ne présentent qu'une élévation isolée de la cholestérolémie.

	Fixation 4°C	Fixation Internalisation 37°C	Dégradation 37°
M. M.	47%	57%	78%
A. M.	61%	108%	111%
Père	49%	61%	68%
Mère	45%	39%	73%

Tableau XVI : Etude de la fixation à 4°C, de la fixation-internalisation et de la dégradation à 37°C des LDL par les fibroblastes des sujets de la famille M.

Les fibroblastes sont incubés en présence de ^{125}I -LDL à 10 $\mu\text{g/ml}$ pendant 2 heures à 4°C ou 4 heures à 37°C.

Les fibroblastes de la mère ont été étudiés lors d'une expérimentation indépendante.

Les résultats sont donnés en pourcentage de l'activité de fibroblastes normaux testés simultanément.

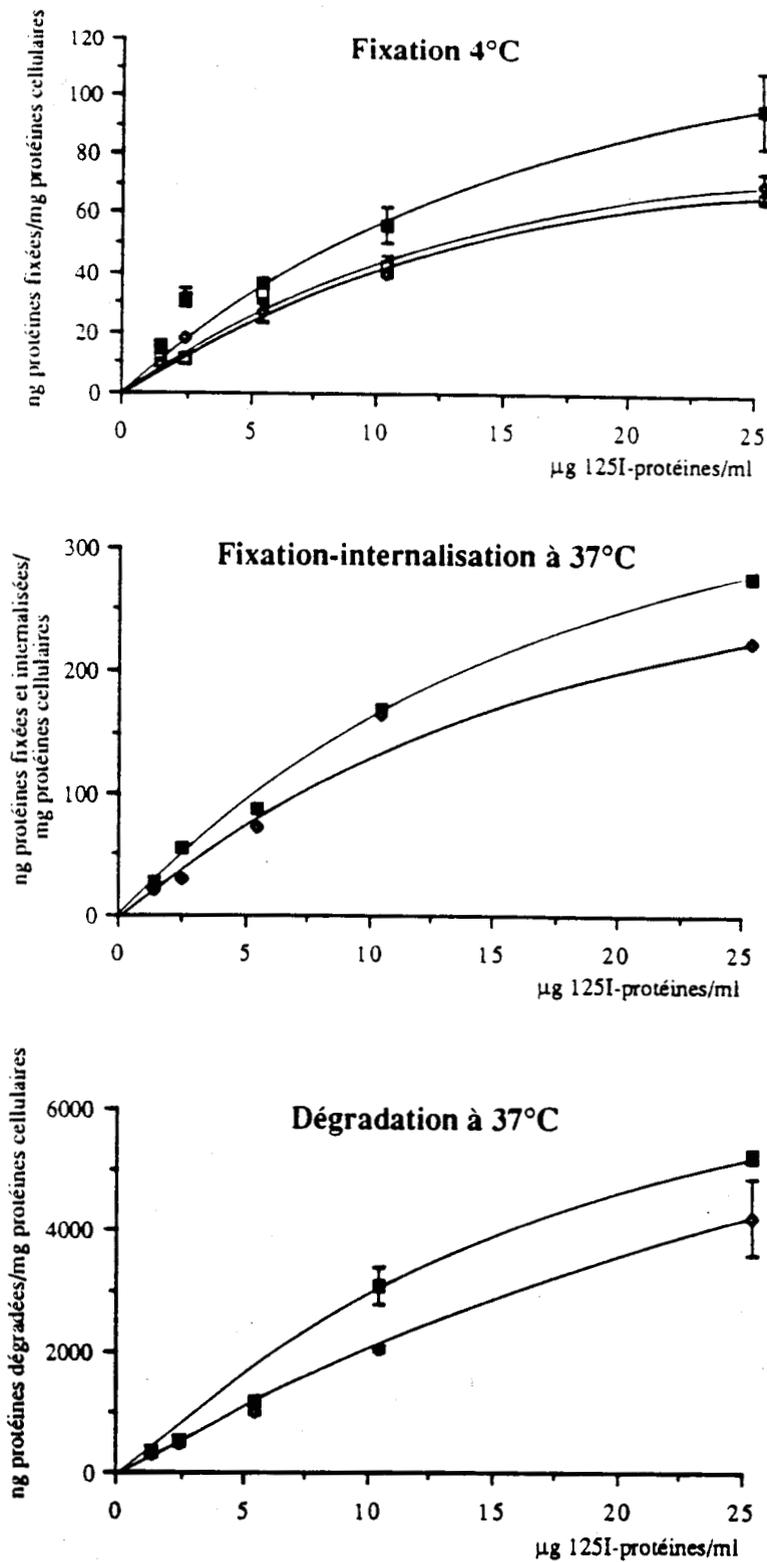


Figure 6A : Etude de la fixation à 4°C, de la fixation-internalisation et de la dégradation à 37°C des LDL par les fibroblastes d'un sujet de la famille M. : M. Les fibroblastes sont incubés en présence d'une gamme de concentrations croissantes de ¹²⁵I-LDL pendant 2 heures à 4°C ou 4 heures à 37°C.

- V., sujet normal
- Z., sujet hétérozygote FH
- M.

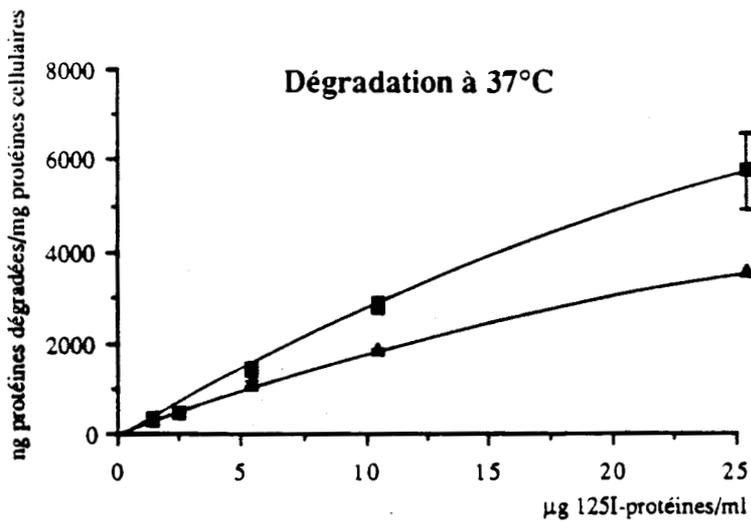
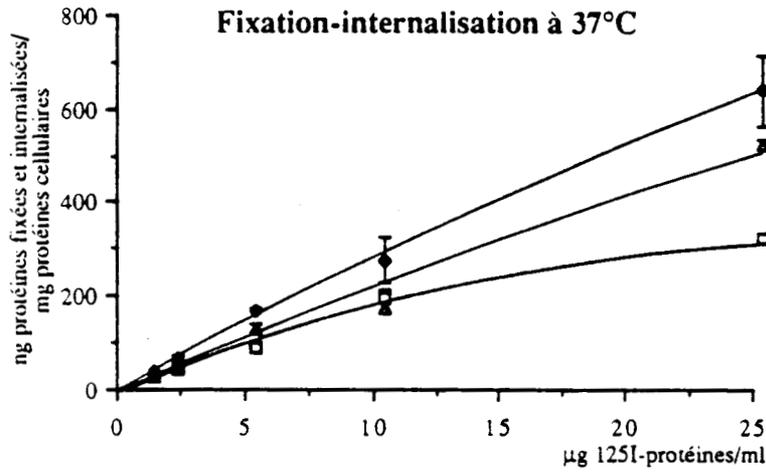
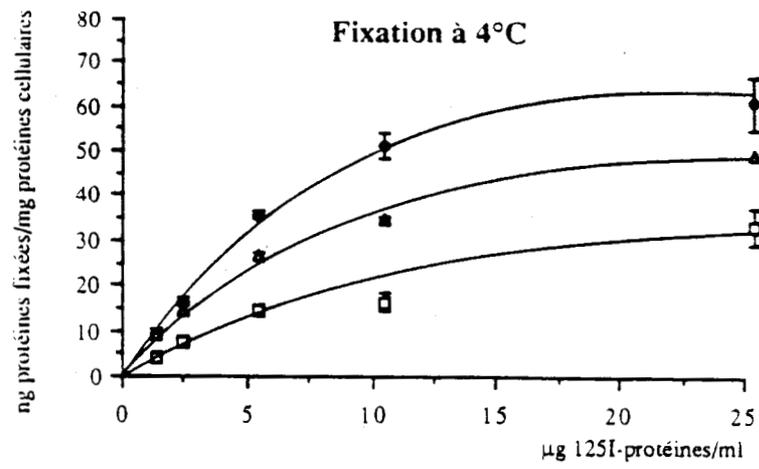


Figure 6B : Etude de la fixation à 4°C, de la fixation-internalisation et de la dégradation à 37°C des LDL par les fibroblastes d'un sujet de la famille M. : A. Les fibroblastes sont incubés en présence d'une gamme de concentration croissantes de ¹²⁵I-LDL pendant 2 heures à 4°C ou 4 heures à 37°C.

- P., sujet normal
- V., sujet normal
- Z., sujet hétérozygote FH
- ▼ A.

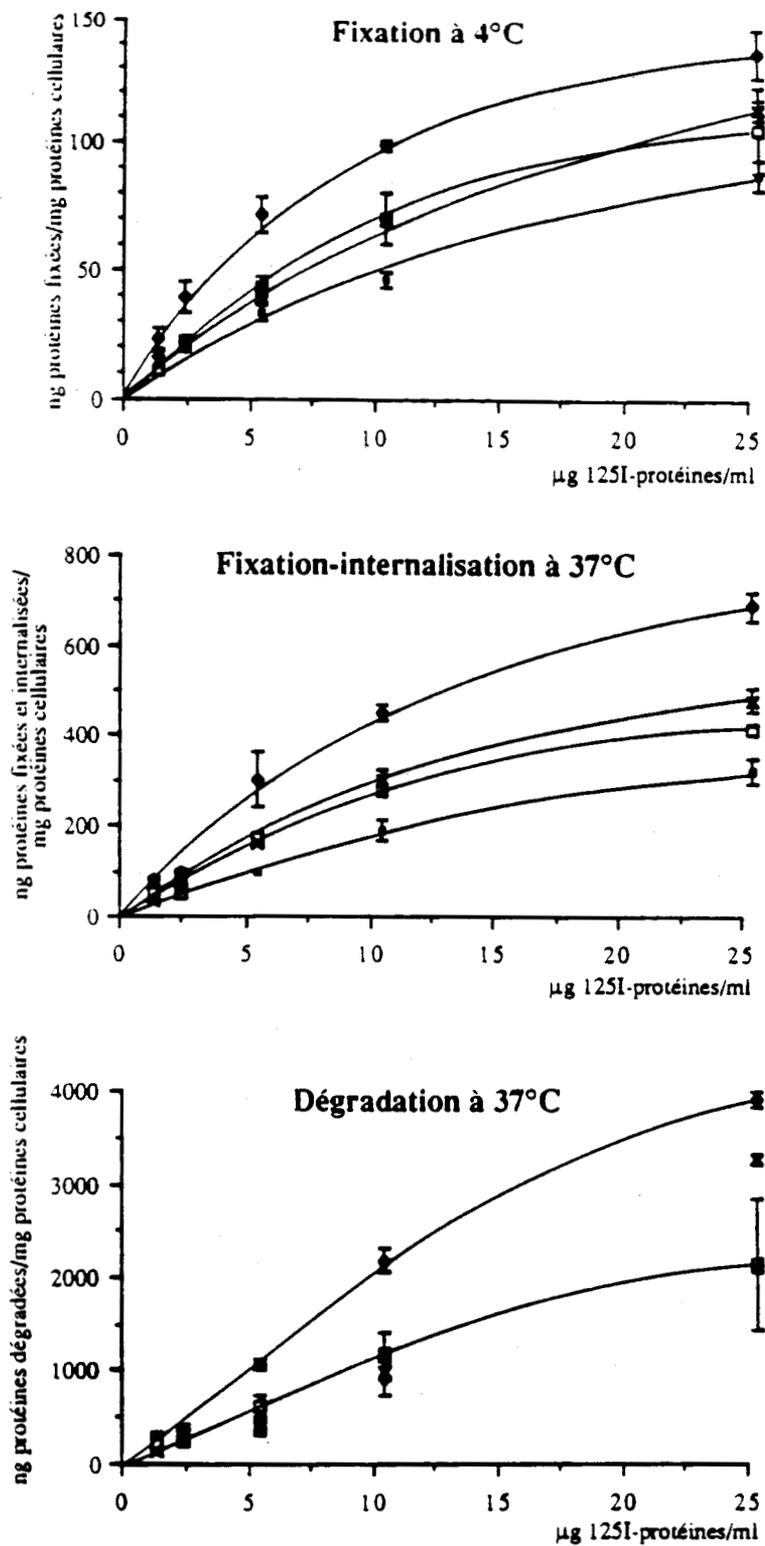


Figure 6C : Etude de la fixation à 4°C, de la fixation-internalisation et de la dégradation à 37°C des LDL par les fibroblastes des sujets de la famille M. : la mère et le père.

Les fibroblastes sont incubés en présence d'une gamme de concentration croissantes de ¹²⁵I-LDL pendant 2 heures à 4°C ou 4 heures à 37°C.

- P., sujet normal
- ◻ Z., sujet hétérozygote FH
- Mère
- × Père

Même si elle n'est, pour aucun des membres de la famille, aussi importante que pour un FH hétérozygote, cette déficience en récepteurs LDL est vraisemblablement un des facteurs intervenant dans l'hypercholestérolémie.

III.2.2. Etude des LDL

a. Caractérisation chimique

La composition chimique des LDL de la famille M. est reportée dans le tableau XVII. Les résultats sont donnés en pourcentage de la masse totale des lipoprotéines et comparés à des LDL normales (deux lots).

La composition chimique des LDL de la famille M. ne présente aucune différence par rapport aux LDL normales témoins. Elle est conforme aux données de la littérature. Nous pouvons donc conclure que la composition chimique des LDL des sujets de la famille M. est normale.

L'électrophorèse des LDL en gel dénaturant est présentée dans la figure 7. Les LDL des quatre sujets de la famille M. migrent de la même façon que les LDL témoins (2 dépôts). Elles ne présentent aucune fragmentation protéolytique, ne mettant de ce fait en évidence aucun phénomène d'oxydation (témoin d'oxydation par le cuivre et de dégradation par la phospholipase A₂ et la lipoxygénase).

b. Etude de l'interaction des LDL des sujets avec les récepteurs LDL cellulaires

- étude sur cellules HeLa

Les cellules HeLa, préincubées pendant 48 heures à 37°C dans un milieu DMEM contenant 10% v/v de LPDS, sont mises en présence de :

- 10 µg ¹²⁵I-LDL/ml
- et d'une concentration croissante (0 à 100 µg/ml) de LDL non marquées de chacun des quatre sujets de la famille M.

Après deux heures à 4°C, la radioactivité associée aux cellules est déterminée.

Les courbes de compétition par les LDL de la famille M. sont comparées à la courbe de compétition réalisées par les LDL normales témoins traitées de la même façon. Cette expérimentation a été réalisée quatre fois sur

LDL	Protéines	Cholestérol total	Cholestérol libre	Cholestérol estérifié	Triglycérides	Phospholipides
M. M.	25%	48%	11%	36%	3%	23%
A. M.	26%	47%	11%	36%	4%	22%
Mère	30%	42%	10%	32%	8%	20%
Père	22%	48%	12%	36%	5%	25%
Témoin	23%-30%	42%-49%	11%-13%	31%-36%	5%	22%

Tableau XVII : Composition chimique des LDL des sujets de la famille M. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la masse totale des LDL et comparés à la composition de deux lots de LDL normales.



Figure 7 : Electrophorèse en gel dénaturant des LDL des sujets de la famille M.
(gel d'acrylamide SDS 3,75-15%)

- 1. M.
- 2. A.
- 3. Père
- 4. Mère
- 5. LDL normales
- 6. LDL normales
- 7. LDL oxydées par le cuivre
- 8. LDL modifiées par voie enzymatique
- TM. témoins de masse

trois lots différents de LDL et sur une durée de 18 mois. La figure 8 exprime la moyenne des résultats en pourcentage de la fixation totale des ^{125}I -LDL en absence de LDL non marquées.

Les LDL de M. M. et A. M. entrent significativement moins en compétition que les LDL normales. En moyenne, les LDL de leur mère et de leur père sont normales. Cependant, pour deux expérimentations sur quatre, les LDL de leur mère avaient moins de capacité à rentrer en compétition que les LDL normales mais les différences n'étaient pas significativement différentes.

- étude sur fibroblastes

Les résultats précédents sont tout à fait confirmés sur les fibroblastes normaux à 4°C, et aussi à 37°C où nous avons testé la fixation-internalisation et la dégradation de ^{125}I -LDL (à 10 µg/ml) en présence d'une concentration croissante de LDL non marquées (Figures 9A et 9B). Sur fibroblastes normaux les deux enfants ont des LDL déficientes aussi bien à 4°C qu'à 37°C. A 4°C, les LDL de la mère semblent normales tandis que les LDL du père semblent légèrement déficientes. Par contre à 37°C, les LDL des deux parents sont aussi déficientes.

- étude sur cellules U937

Le tableau XVIII présente les résultats obtenus par l'équipe de Frostegard sur les LDL des sujets de la famille M. et les cellules U937.

Il apparaît que les LDL des deux enfants sont moins efficaces pour stimuler la croissance de ces cellules que les LDL normales.

Par contre, les LDL de la mère semblent normales et celles du père légèrement déficientes.

- conclusion

Les quatre sujets de cette famille ont des LDL qui présentent une déficience de fixation aux récepteurs LDL cellulaires. Pour les deux enfants, cette déficience est importante. Pour les parents, elle semble plus légère et n'apparaît que dans quelques tests.

Cette déficience ne s'explique pas par des modifications majeures de la composition chimique (composition chimique comparable à celle des LDL normales), ni à une profonde altération de l'apoB (migration identique à celle des LDL normales, en gel dénaturant).

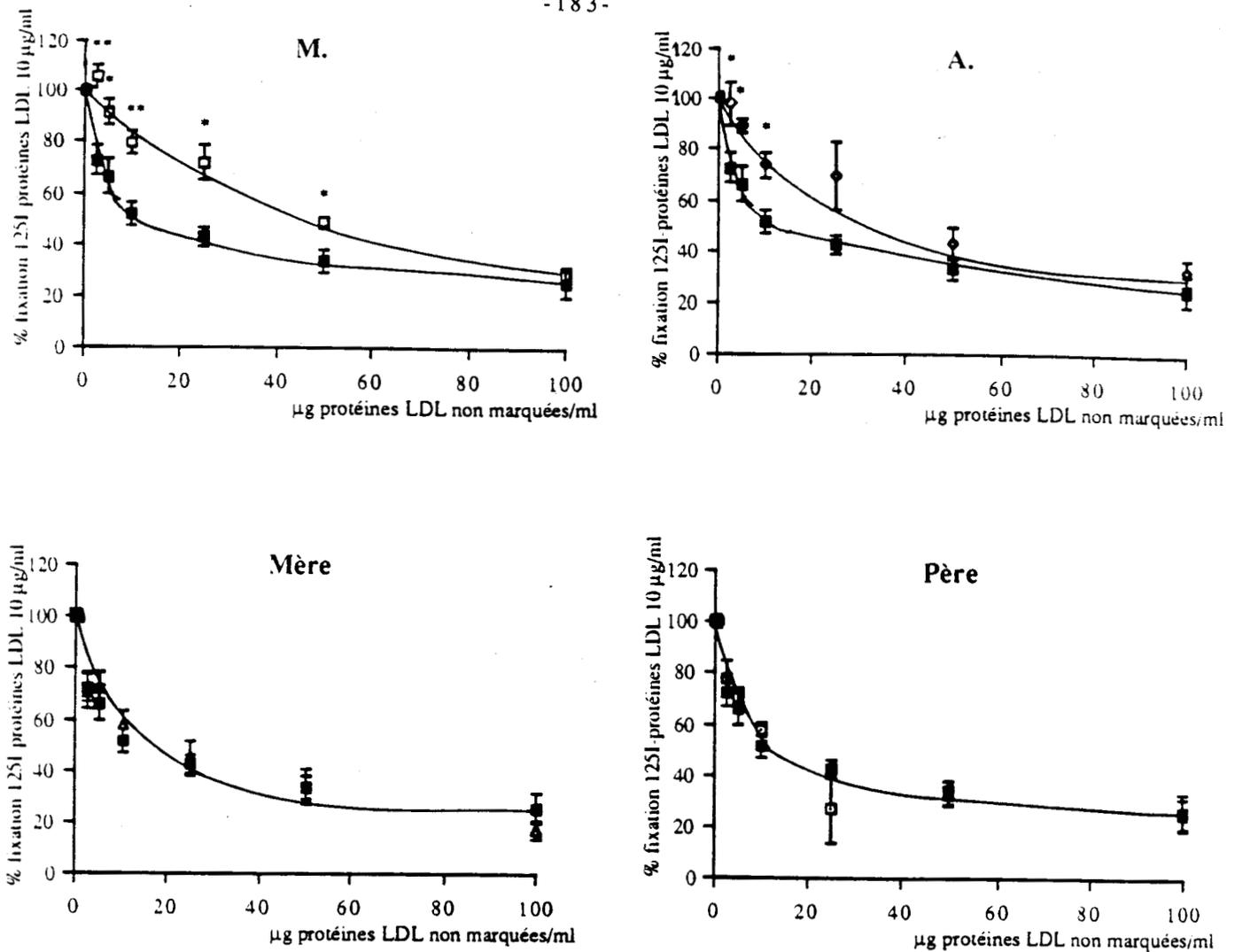


Figure 8 : Courbes de compétition à 4°C sur les cellules HeLa entre les ¹²⁵I-LDL et les LDL des sujets de la famille M.

Les cellules HeLa sont incubées pendant 2 heures à 4°C en présence de ¹²⁵I-LDL à 10 µg/ml et une gamme de concentrations croissantes de LDL des sujets de la famille M.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fixation totale des ¹²⁵I-LDL en absence de LDL non marquées et comparés à la compétition par des LDL normales. Les courbes représentent la moyenne de 4 déterminations en double et le test de Mann et Whitney a été utilisé pour comparer, pour chaque point, la compétition par les LDL normales et les LDL des patients (** p < 0,01 ; * p < 0,05).

- LDL normales
- M.
- A.
- ▲ Mère
- ◻ Père

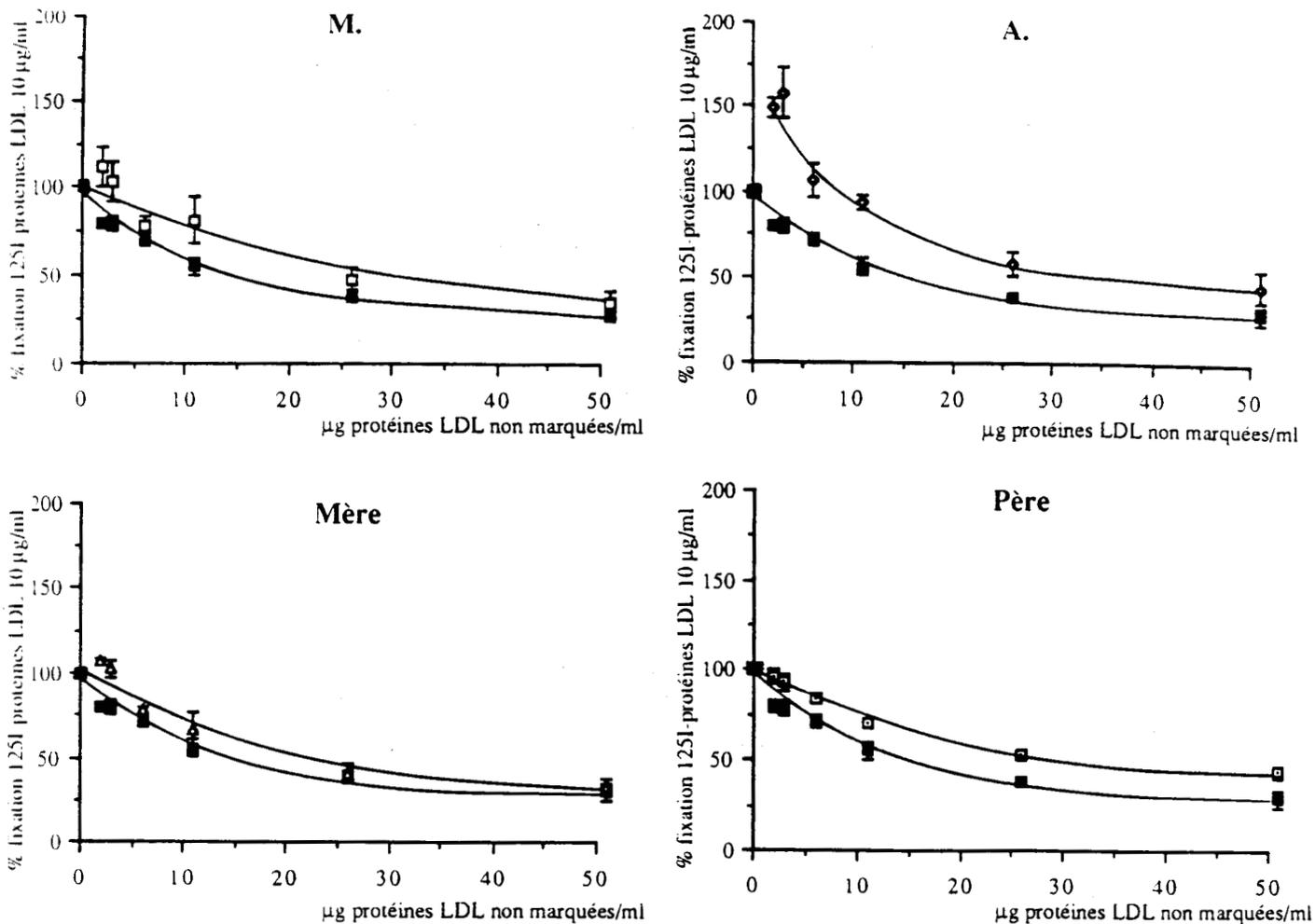


Figure 9A : Courbes de compétition sur des fibroblastes normaux entre les ¹²⁵I-LDL et les LDL des sujets de la famille M. : étude de la fixation-internalisation.

Les fibroblastes sont incubés pendant 4 heures à 37°C en présence de ¹²⁵I-LDL à 10 µg/ml et une gamme de concentrations croissantes de LDL des sujets de la famille M. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fixation-internalisation totale des ¹²⁵I-LDL sans LDL non marquées (2 déterminations en double) et comparés à la compétition par des LDL normales.

- LDL normales
- M.
- ◆ A.
- ▲ Mère
- Père

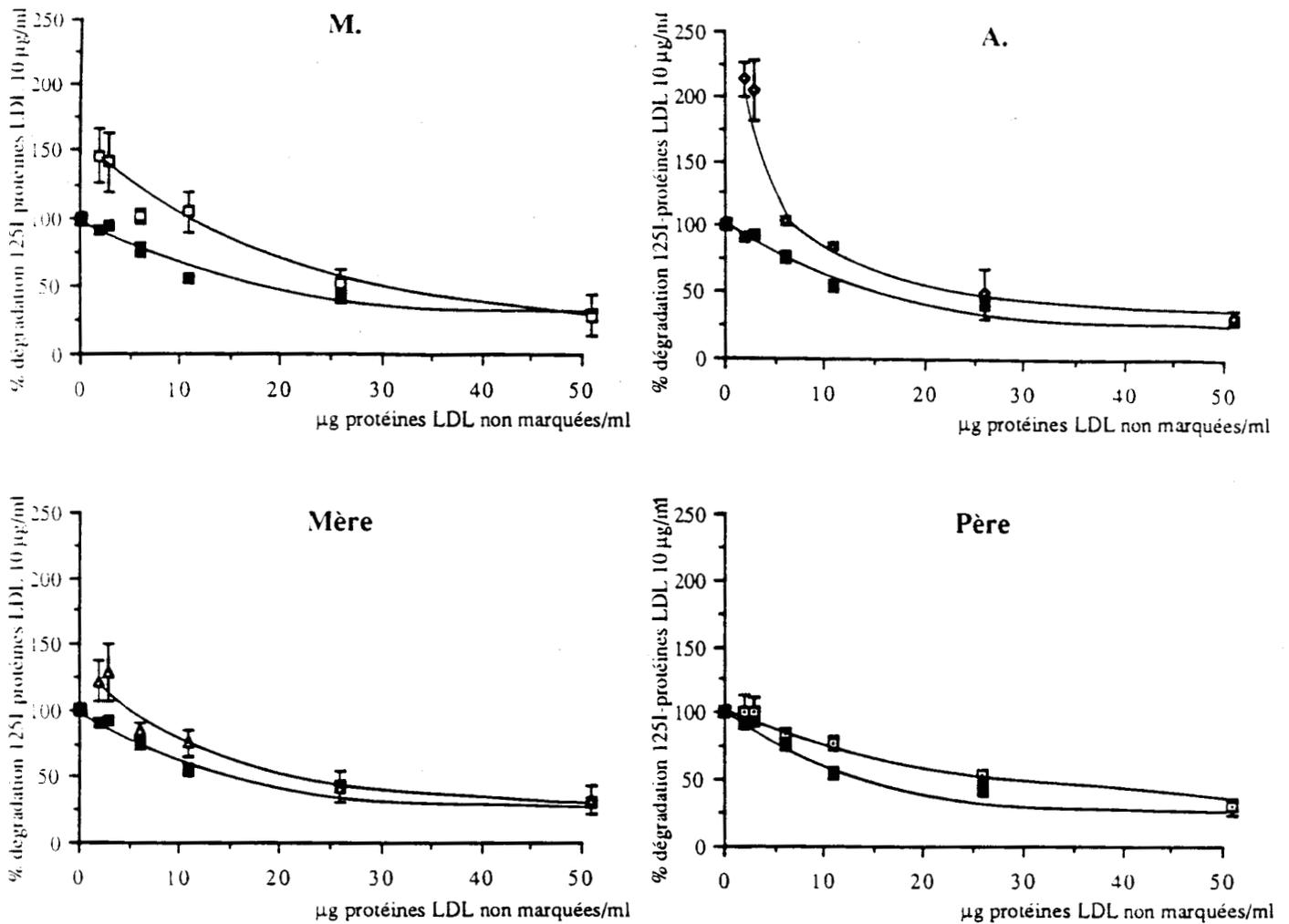


Figure 9B : Courbes de compétition à 37°C sur des fibroblastes normaux entre les ¹²⁵I-LDL et les LDL des sujets de la famille M. : étude de la dégradation.

Les fibroblastes sont incubés pendant 4 heures à 37°C en présence de ¹²⁵I-LDL à 10 µg/ml et une gamme de concentrations croissantes de LDL des sujets de la famille M. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dégradation totale des ¹²⁵I-LDL sans LDL non marquées (2 déterminations en double) et comparés à la compétition par des LDL normales.

- LDL normales
- M.
- ◆ A.
- ▲ Mère
- Père

M.M.	51%
A. M.	43%
Mère	101%
Père	85%

Tableau XVIII : Etude des LDL des sujets de la famille M. sur les cellules U937.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la croissance cellulaire obtenue avec des LDL normales.

Il nous a donc paru important de tester l'accessibilité de différents épitopes des LDL en utilisant des anticorps monoclonaux dont la spécificité vis-à-vis de certains épitopes de l'apoB a été démontrée.

c. Etude des épitopes de l'apoB des LDL

Nous avons réalisé une compétition entre des ^{125}I -LDL normales à concentration fixe et des LDL des patients de la famille M. ou des LDL normales témoins à des concentrations croissantes. Sept anticorps monoclonaux, reconnaissant différentes régions de l'apoB, ont été utilisés.

Les résultats de ces compétitions sont résumés dans le tableau XIX.

L'expression des épitopes reconnus par les différents anticorps monoclonaux est indiquée pour chaque sujet de la famille M.. Si la valeur du dosage de l'épitope est supérieure à 100% (valeur de l'expression de l'épitope des LDL témoins), cela signifie que l'accessibilité de l'épitope est moins grande que pour les LDL témoins, il faut alors une concentration plus importante de LDL à tester pour réaliser la même compétition qu'avec les LDL normales.

Par contre, si la valeur mesurée pour l'épitope est inférieure à 100%, cela signifie que pour les LDL à tester, l'accessibilité de l'épitope est plus grande et donc qu'il faut moins de LDL à tester que de LDL témoins pour réaliser la même compétition.

Des analyses statistiques (test t de Student, variance à un facteur, test t de comparaison multiple) ont permis d'apprécier la signification des différences entre les LDL des sujets et les LDL normales (signification vs LDL normales) et entre les LDL de M. M., A. M. et leur mère et celles du père (signification vs LDL père).

L'affinité des épitopes des LDL des sujets vis-à-vis de chaque anticorps monoclonal est comparée avec celle des épitopes des LDL normales. Aucune différence significative de l'affinité n'est observée.

- *anticorps monoclonal B1*

L'épitope B1 (épitope de séquence) est moins accessible sur les 4 LDL testées que sur LDL normales.

Anticorps monoclonal	Sujet de la famille M.	Expression de l'épitope	Signification		Affinité apparente	
			vs LDL normales	vs LDL père	LDL normales	LDL sujet
B1	M.	171,6 ± 11,5	**	**	-2,2	-2,35
	A.	152,1 ± 19,8	*	**		-2,35
	mère	113,7 ± 1,8	**	NS		-2,1
	père	114,8 ± 3,7	*	-		-2,1
B4	M.	130,4 ± 0,3	***	***	-3,57	-3,4
	A.	142,9 ± 1,7	***	***		-3,5
	mère	132,4 ± 0,8	***	***		-3,6
	père	107,5 ± 1,9	*	-		-3,7
DA7	M.	116,9 ± 9,2	NS	NS	-2,47	-2,2
	A.	99,7 ± 6,7	NS	NS		-2,3
	mère	121,1 ± 6,3	*	NS		-2,1
	père	112,4 ± 0,7	**	-		-2,25
BA11	M.	123,3 ± 1,8	**	*	-1,3	-1,25
	A.	113,9 ± 0,7	***	NS		-1,4
	mère	89,6 ± 11,2	NS	NS		-1,3
	père	98,8 ± 13,6	NS	-		-1,3
BL3	M.	136,4 ± 6,5	**	NS	-2,15	-2,75
	A.	137,9 ± 3,2	**	NS		-2,6
	mère	146,9 ± 18,9	*	NS		-2,1
	père	115,1 ± 9,1	NS	-		-2,1
BL5	M.	83,5 ± 0,8	***	**	-1,9	-2,1
	A.	91,1 ± 1,0	**	**		-1,85
	mère	108,0 ± 6,8	NS	**		-2,1
	père	129,6 ± 14,5	NS	-		-2,1
BL7	M.	155,0 ± 5,7	**	***	-2,15	-2,2
	A.	150,2 ± 4,1	**	***		-1,65
	mère	104,6 ± 16,9	NS	NS		-2,1
	père	101,1 ± 1,6	NS	-		-2,1

Tableau XIX : Etude des épitopes de l'apoB des LDL des sujets de la famille M. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'expression des épitopes des LDL normales traitées en même temps.

L'affinité apparente est la pente de la droite obtenue après régression de la courbe de dosage des épitopes. Elle est exprimée en unités arbitraires.

*** p < 0,001 ; ** p < 0,01 ; * p < 0,05.

Cependant le défaut est plus accentué pour M. M. et A. M., car l'expression de l'épitope est significativement plus élevée chez les deux enfants que chez les parents.

- anticorps monoclonal B4

L'épitope reconnu par l'anticorps B4 (épitope de séquence) est moins accessible pour les LDL de la mère et ses deux filles. Les LDL du père ont un comportement normal.

- anticorps monoclonal DA7

L'épitope reconnu par l'anticorps DA7 dépend de la conformation des LDL et l'anticorps DA7 reconnaît deux protéines de fusion différentes proches l'une de l'autre sur la séquence de l'apoB dans la partie amino-terminale de la région de fixation au récepteur LDL.

L'épitope des LDL du père est moins accessible. Nous observons des différences légèrement plus importantes chez M. M. et chez sa mère mais l'écart type étant important, ces différences ne sont pas significatives.

Les LDL des quatre sujets ne semblent pas différentes des LDL normales.

- anticorps monoclonal BA11

L'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal BA11 est situé dans la zone de fixation au récepteur LDL. Cet épitope est significativement moins accessible pour les LDL des deux enfants que pour les LDL normales. La différence devient moins significative quand elles sont comparées aux LDL du père.

- anticorps monoclonal BL3

L'anticorps monoclonal BL3 reconnaît un épitope de séquence.

La mère et le père ont des LDL qui apparaissent normales. Les LDL des deux enfants sont moins accessibles à l'anticorps. Cependant elles n'ont pas un comportement significativement différent de celles du père et de la mère.

- anticorps monoclonal BL5

L'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal BL5 est un épitope conformationnel, ne reconnaissant aucune des protéines de fusion décrites jusqu'à présent.

L'accessibilité de cet épitope est plus importante pour les LDL de M. M. et A. M. Par contre, leurs parents ont des LDL qui se comportent comme les LDL normales.

- anticorps monoclonal BL7

Cet anticorps reconnaît un épitope de séquence situé dans la région de l'acide aminé 2331.

L'épitope de l'apoB des LDL de M. M. et A. M. est significativement moins bien reconnu que celui de l'apoB des LDL normales et des LDL des parents.

Nous observons donc que l'expression des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux étudiés est différente selon les LDL. Les différences les plus marquées sont observées avec les anticorps B1, B4, BL5 et BL7.

Les LDL du père se comportent comme des LDL normales vis-à-vis de ces anticorps, alors que chez la mère et ses deux enfants, l'accessibilité des épitopes B1, B4 et BL7 est diminuée (sauf pour les LDL de la mère avec le BL7). L'accessibilité est plus importante pour l'épitope BL5 des LDL de M. M. et A. M.

L'immunoréactivité des LDL de M. M. et A. M. vis-à-vis de l'anticorps B111 (épitope situé dans la zone de fixation au récepteur LDL) est différente de celle des LDL normales de référence. Ces résultats confirment ceux obtenus sur les cellules où nous avons observé une déficience marquée de fixation des LDL des deux enfants sur le récepteur LDL.

Les anticorps B1, B4 et BL7 couvrent toute la moitié NH₂-terminale de l'apoB. Il n'y a donc pas vraiment de zone bien définie de modification de l'apoB des LDL des enfants et de leur mère. La conformation semble être altérée (anticorps monoclonal BL5). Il apparaît donc que pour les LDL des deux enfants et de leur mère, il existe un problème de conformation générale de l'apoB (peut-être plutôt dans la moitié amino-terminale).

La littérature rapporte de nombreuses études montrant que l'accessibilité de l'apoB dans les lipoprotéines est lipido-dépendante (Milne et al., 1987 ; Kleinman et al., 1988). Plus précisément, Fievet et al. (1988) ont montré, chez des sujets diabétiques, que l'accessibilité des épitopes reconnus par l'anticorps monoclonal BL5 (épitope conformationnel) est corrélée aux variations du rapport phospholipides/cholestérol (lipides de surface des lipoprotéines). La composition chimique déterminée dans le paragraphe III.2.2.a. ne nous permet pas de distinguer des variations de lipides entre les LDL des deux enfants et les LDL témoins. Bien que l'altération des LDL ne semble pas venir d'un environnement lipidique modifié globalement, nous nous proposons, dans un proche avenir, d'étudier les différentes classes de phospholipides des LDL des sujets de cette famille par rapport à des LDL témoins, des études ayant montré que des compositions différentes en phospholipides pouvaient conduire à des modifications de fluidité des lipoprotéines.

Ce qui nous semble le plus probable est qu'il existe une altération de la conformation de l'apoB dans son ensemble et que cela ne doit pas être dû à une simple modification de la répartition qualitative et quantitative des lipides. Il est possible par exemple qu'une mutation sur un acide aminé modifie toute la forme de la protéine surtout si cet acide aminé est impliqué dans des structures secondaires importantes (pont disulfure, hélice alpha...).

d. Recherche de la mutation 3500

Après amplification de la région entourant la paire de base 10699, le DNA est transféré sur une membrane de nitrocellulose. La mutation 3500 est détectée grâce à l'hybridation avec un oligonucléotide spécifique de l'allèle mutant. L'oligonucléotide étant marqué au Phosphore ^{32}P , la révélation de l'hybridation est réalisée par autoradiographie (Figure 10). L'allèle normal s'hybride avec un autre oligonucléotide spécifique.

L'oligonucléotide spécifique de l'allèle mutant caractéristique de la mutation 3500 ne s'hybride au DNA d'aucun des trois sujets de la famille M. étudiés.

M. M., A. M. et leur père ne présentent donc pas la mutation 3500.

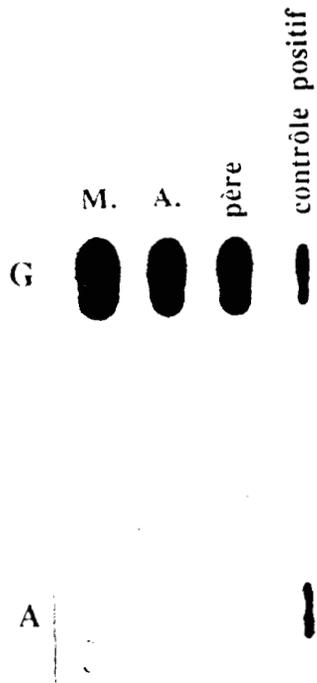


Figure 10 : Autoradiographie du DNA des sujets de la famille M., amplifié et transféré sur nitrocellulose, puis hybridé avec des oligonucléotides marqués au P32 spécifiques de l'allèle normal (G) et de l'allèle mutant (A).

c. Discussion

Weisgraber et al. (1988) ont montré que chez les sujets présentant la mutation 3500 de l'apoB, les LDL sont mieux reconnues par l'anticorps monoclonal MB47 que les LDL normales. Cet anticorps reconnaît un épitope de l'apoB situé dans la zone de fixation au récepteur LDL. Le dosage de l'épitope dans les LDL dont l'apoB est mutante est de l'ordre de 60% (100% étant assigné aux LDL normales) (Chapitre I, page 57, Figure 16).

Il est intéressant de noter que dans la famille M. que nous étudions, c'est l'effet inverse qui est observé pour l'anticorps BA11 dont la zone de reconnaissance est proche mais non identique à celle du MB47. En effet, les LDL de nos malades ont l'épitope BA11 moins accessible que les LDL normales.

D'autre part, l'ensemble de la LDL semble être modifié (variation de l'expression des épitopes de différents anticorps couvrant pratiquement toute la protéine).

Toutes les différences d'accessibilité sont plus marquées chez les deux enfants, confirmant, par une approche tout à fait différente, les résultats obtenus vis-à-vis du récepteur cellulaire.

III.3. Conclusion

Dans la famille M., nous observons une déficience du récepteur LDL qui ne semble pas aussi importante que dans le cas d'hétérozygote FH.

La déficience des LDL semble aussi être un facteur intervenant dans l'hypercholestérolémie. En effet, différentes approches montrent que les LDL de ces sujets sont moins bien reconnues par les récepteurs LDL cellulaires (cellules HeLa et fibroblastes). Les LDL des enfants présentent une capacité diminuée de moitié par rapport à des LDL normales pour promouvoir la croissance de cellules U937. De plus, l'accessibilité de certains épitopes de l'apoB est différente de celle des LDL normales.

Il est donc actuellement indispensable, pour préciser la nature des modifications observées, d'entreprendre dans cette famille une étude des gènes de l'apoB et du récepteur LDL.

Des résultats préliminaires obtenus grâce à une collaboration avec le Dr. Humphries nous ont permis d'éliminer l'éventualité de la mutation 3500 pour M. M., A. M. et leur père.

IV. SUJETS SELECTIONNES POUR UN DEFICIT EN APOB

Une collaboration avec le Dr. Humphries nous a amenés à étudier l'activité des récepteurs LDL de lymphoblastes provenant de la transformation de lymphocytes de patients dont l'apoB présente la mutation 3500. L'étude de la mutation 3500 chez 10 de ces patients a fait l'objet d'une publication (Tybjaerg-Hansen et al., 1990).

Le but de ce travail était d'étudier l'état fonctionnel du récepteur LDL chez ces patients afin de vérifier que l'hypercholestérolémie observée était bien liée à la modification du ligand.

En effet, les hypercholestérolémies décrites par Innerarity et al. (1987) et résultant d'une mutation au niveau de l'acide aminé 3500 de l'apoB semblaient être modérées et donc différentes en gravité par rapport à celle engendrées par un déficit en récepteur LDL. Par contre chez les patients décrits par Tybjaerg-Hansen et al. (1990), la cholestérolémie était plus élevée que celle rapportée par Innerarity et al..

On pouvait alors s'interroger sur l'éventuelle présence simultanée d'un déficit en récepteur et d'une déficience du ligand, 3 des patients entrant dans notre étude ayant un bilan biochimique et clinique identique à celui de patients hétérozygotes FH.

IV.1. Matériels et méthodes

IV.1.1. Les sujets

La mutation 3500 de l'apoB a été recherchée dans deux groupes de patients du Royaume Uni, du Danemark et de Suède :

- 374 sujets présentant divers phénotypes d'hypercholestérolémie (familiale ou non),
- 371 sujets souffrant d'athérosclérose primaire (maladie coronarienne ou des artères périphériques).

IV.1.2. La mutation 3500 de l'apoB

Une région de 345 paires de bases, entourant la mutation de l'apoB à la position 10699, est amplifiée par PCR. Après transfert sur nitrocellulose, des oligonucléotides spécifiques sont utilisés pour détecter la présence de l'allèle mutant.

IV.1.3. L'activité des récepteurs LDL

L'activité des récepteurs LDL a été étudiée sur les cellules de 5 sujets présentant la mutation 3500. Les lymphocytes sont isolés du sang recueilli sur citrate (Boyüm, 1968) puis transformés par le virus Epstein-Barr (Neitzel, 1986).

Les lymphoblastes sont cultivés en milieu RPMI contenant 10% v/v de SVF.

24 heures avant le test, les cellules sont lavées en RPMI puis remises en suspension en milieu RPMI contenant 1% p/v de SAB.

L'activité des récepteurs LDL est évaluée par immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C utilisant le système "LDL + anti-LDL + FITC Ig" (cf chapitre II III. ; Benhamamouch et al., 1988) et comparée à des cellules normales et hétérozygotes FH (cf chapitre II IV.).

IV.2. Résultats

IV.2.1. Les bilans lipidiques

Le tableau XX résume les bilans lipidiques (en g/l) des patients dont l'apoB est mutante et dont nous avons étudié l'activité du récepteur LDL.

IV.2.2. La mutation 3500

Parmi les 745 sujets étudiés, dix ont été identifiés hétérozygotes pour la mutation 3500 de l'apoB.

patient	sexe	âge	lipides g/l			
			chol. T	LDL-chol	HDL-chol	TG
A. C.	F	40	3,28	2,24	0,6	0,69
R. D.	F	43	3,09	2,39	0,63	0,39
K. F.	F	45	3,9	3,47	0,27	0,83
E. S.	F	54	4,32	3,39	0,75	0,79
R. S.	M	63	2,74	2,14	0,33	1,35
patients mutation 3500		49 ± 8,4	3,47 ± 0,57	2,73 ± 0,58	0,52 ± 0,18	0,81 ± 0,31
hétérozygotes FH n=88		≥ 20	3,67 ± 0,08	2,97 ± 0,08	0,42 ± 0,01	1,48 ± 0,08
normaux n=76		≥ 20	1,93 ± 0,04	1,23 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,78 ± 0,03

Tableau XX : Bilan lipidique des patients hétérozygotes pour la mutation 3500 de l'apoB.

Chol. : cholestérol

TG : triglycérides

Parmi ces dix patients, six avaient été classés hétérozygotes FH (3%) et trois souffraient d'hyperlipidémie non FH (3%). Un seul des patients souffrant de maladie vasculaire (sur 371) a la mutation 3500 de l'apoB.

IV.2.3. L'activité des récepteurs LDL (Tableau XXI)

Sur cinq patients dont nous avons étudié l'activité des récepteurs LDL :

- un a une activité déficiente des récepteurs LDL, dans les mêmes proportions que la souche hétérozygote FH (R. D.),
- deux ont une activité normale des récepteurs LDL, dans les mêmes proportions que la souche normale (A. C. et K. F.),
- deux ont une activité des récepteurs LDL diminuée par rapport à la souche normale, mais pas aussi déficiente que la souche hétérozygote FH (E. S. et R. S.).

IV.3. Discussion

Dans l'étude publiée par Tybjaerg-Hansen et al. (1990), tous les patients présentant la mutation 3500 de l'apoB au Royaume Uni et au Danemark ont été identifiés parmi les sujets classés hétérozygotes FH ou souffrant d'hyperlipidémie non FH.

La mutation n'a pas été détectée chez des patients britanniques souffrant d'un autre type d'hyperlipidémie athérogène. La mutation est donc rare chez les patients atteints d'athérosclérose primaire.

Malgré le petit échantillon de patients examinés, une première estimation de la fréquence de cette mutation peut être faite. Elle serait de 1/600, donc très proche de la fréquence de l'hypercholestérolémie familiale de type hétérozygote.

Les travaux de Innerarity et al. (1987) avaient suggéré que, dans le cas de la mutation 3500, l'hypercholestérolémie observée était modérée par rapport à celle observée dans le cas de l'hypercholestérolémie familiale de type hétérozygote.

Les résultats présentés par Tybjaerg-Hansen et al. (1990) et confirmés par ceux de Schuster et al. (1990) montrent cependant que les dosages des

patient	sexe	âge	caractéristiques cliniques							Mutation apoB 3500	Activité du récepteur LDL
			Maladie cardiovasculaire	Xanthomes tandineux	Xanthe- lasmas	Arc cornéen	ACV	Diagnostic clinique	Traitement		
A. C.	F	40	-	-	-	-	+	HC	?	+	Normale
R. D.	F	43	-	+	-	-	+	FH	Questran (chol. 2,16 g/l)	+	Déficiente
K. F.	F	45	angine	-	+	-	+	FH	Questran + Bézafibrate (chol. 3,24 g/l)	+	Normale
E. S.	F	54	-	+	-	-	+	FH	Questran (chol. 3,05 g/l)	+	Intermédiaire
R. S.	M	63	Infarctus 57 ans Pont. cor. 59 ans	?	+	+	+	HC	?	+	Intermédiaire

Tableau XXI : Caractéristiques cliniques et activité du récepteur LDL chez les patients hétérozygotes pour la mutation 3500 de l'apoB.

ACV : antécédents familiaux de maladie cardiovasculaire

HC : hypercholestérolémie non FH

Pont. cor. : pontage coronarien



lipides plasmatiques chez ces patients sont tout à fait comparables à ceux d'hétérozygotes FH.

Parmi les cinq patients que nous avons étudiés dans notre laboratoire, un présente une déficience de l'activité des récepteurs LDL sur lymphocytes transformés. Ce patient avait été classé cliniquement hétérozygote FH. Les quatre autres ont une activité normale ou légèrement déficiente.

IV.4. Conclusion

La mutation 3500 de l'apoB a été détectée chez dix patients originellement diagnostiqués sur le plan clinique et biologique comme hétérozygotes FH ou hyperlipidémiques non FH.

Les patients sont hétérozygotes pour la mutation 3500 et ressemblent aux hétérozygotes FH au niveau :

- du bilan lipidique,
- de la fréquence des maladies cardiovasculaires,
- de la fréquence des xanthomes et des arcs cornéens,
- de la présence d'antécédents familiaux de maladies coronariennes.

Les auteurs en concluent donc que la mutation 3500 apparait comme un désordre sérieux, conduisant à des maladies cardiovasculaires précoces.

Nous avons étudié cinq de ces dix patients et avons diagnostiqué un sujet (R. D.) dont l'activité des récepteurs LDL était déficiente. La présence de la mutation 3500 de l'apoB peut donc coexister avec un défaut au niveau du récepteur LDL. Ce patient, souffrant des deux défauts, ne peut se distinguer des autres par son bilan lipidique ou ses caractéristiques cliniques. Inversement, l'un d'entre eux (K. F.), classé cliniquement hétérozygote FH, ne semble pas présenter de défaut du récepteur LDL.

Nous confirmons donc que la mutation 3500 de l'apoB peut conduire à un tableau biologique et clinique identique à celui des sujets hétérozygotes pour un déficit en récepteurs LDL (cas du sujet K. F.).

Nous montrons que chez un sujet hétérozygote FH (sujet R. D.), la présence de la mutation 3500 de l'apoB "n'aggrave" pas le bilan biologique et clinique.

Cependant le bilan décrit pour ces patients est limité (cholestérol total, LDL-cholestérol, triglycérides). Il serait donc intéressant d'établir, pour les patient hétérozygotes pour la "mutation 3500", un bilan lipidique, lipoprotéinique et apolipoprotéinique complet.

V. LA FAMILLE Y.

Nous avons utilisé trois approches différentes pour évaluer l'activité des récepteurs LDL de deux lignées lymphoblastiques. Ces cellules sont obtenues par transformation par le virus Epstein-Barr des lymphocytes de deux patients hypercholestérolémiques. Ce sont deux frères (Ma. Y. et Mi. Y.), issus d'une famille hypercholestérolémique.

Nos travaux, sur leurs cellules, confirment tout à fait l'étude génétique réalisée par l'équipe du Dr. Humphries sur le gène du récepteur LDL de ces patients.

V.1. Matériels et méthodes

V.1.1. Les sujets

Ma. Y. et Mi. Y. sont issus d'une famille hypercholestérolémique (Figure 11).

L'étude de RFLP (NcoI) a montré que Mi. Y. a hérité de sa mère l'allèle défectueux du gène du récepteur LDL, alors que Ma. Y., lui aussi hypercholestérolémique, a hérité de l'autre allèle.

Des travaux très récents (King-Underwood et al., soumis pour publication) ont permis l'identification d'une mutation de la proline en leucine à la position 664 du récepteur LDL de Mi. Y.. Son frère, Ma. Y., n'est pas atteint par ce défaut du récepteur LDL.

Aucun des deux sujets ne souffre de la mutation 3500 de l'apoB (Tableau XXII).

V.1.2. Les cellules

Les lymphocytes sont isolés du sang par la méthode de Boyüm (Fiche technique n°10).

La transformation par le virus Epstein-Barr est réalisée selon Neitzel (1986).

Les lymphoblastes sont cultivés en milieu RPMI contenant 10% v/v de SVF.

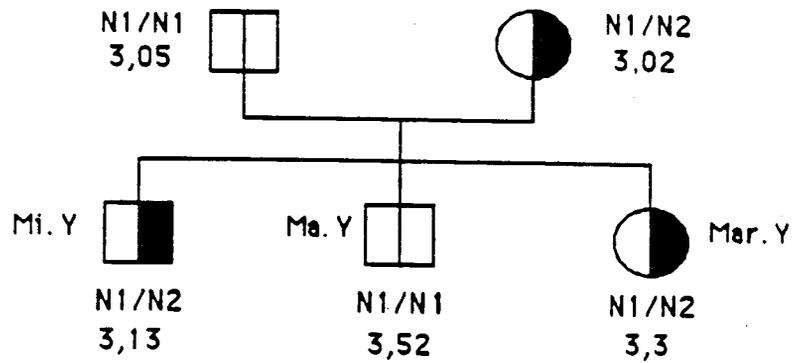


Figure 11 : La Famille Y.

N1 et N2 sont les allèles du gène du LDL récepteur. L'allèle défectueux est sur le chromosome défini par l'allèle N2 du RFLP NcoI.

La cholestérolémie à jeun (en g/l) est donnée pour chaque membre de la famille.

Sujet	Age	Lipides g/l				Signes cliniques	Mutation apoB 3500	Mutation sur le récepteur LDL
		Chol. total	LDL chol.	HDL chol.	TG			
Ma. Y.	32	3,52	2,7	0,58	1,22	-	-	-
Mi. Y.	34	3,13	2,32	0,62	0,87	Angine de poitrine	-	Pro 664 -> Leu hétérozygote

Tableau XXII : Bilan lipidique, signes cliniques, gènes de l'apoB et du récepteur LDL de Ma. Y. et Mi. Y.

Chol. : cholestérol

TG : triglycérides

24 heures avant l'étude de l'activité des récepteurs LDL, les cellules sont lavées une fois en RPMI puis remises en suspension en milieu RPMI contenant 10% p/v de SAB, à raison de $1,25 \cdot 10^6$ cellules/ml. Dans le même temps, une plaque de 96 cupules dans lesquelles se feront les incubations est saturée avec du milieu RPMI/SAB.

V.1.3. Les lipoprotéines

Les LDL sont isolées à partir du plasma de sujets normolipidiques entre les densités 1,030 et 1,053 par ultracentrifugation séquentielle (Fiche technique n°1 ; Havel et al., 1955).

Les LDL sont marquées au DiI (Fiche technique n°6 ; Pitas et al., 1981).

Pour les études en radioligand, les LDL sont marquées à l'Iode ^{125}I (Fiche technique n°5).

V.1.4. Les méthodes de dosage du récepteur LDL

Trois approches différentes d'évaluation de l'activité du récepteur LDL sont utilisées.

Ces méthodes sont décrites dans le chapitre II IV.

V.2. Résultats

V.2.1. Etude de l'activité des récepteurs LDL à 4°C par radioligand

Nous avons montré, dans le chapitre II, que l'étude des patients n'était possible que si les cellules étaient comparées, au cours d'une même expérimentation, avec des cellules normales.

L'activité à 4°C des récepteurs LDL de Ma. Y. et Mi. Y. a donc été comparée à celle d'une souche normale (M. F.) et d'une souche hétérozygote FH (Iceland 4A).

Souche	Kd (nm)	N
M. F.	24,9	30100
Iceland 4A	14,7	17500
Ma. Y.	22,4	27400
Mi. Y.	7,4	14200

Tableau XXIII : Valeurs de la constante de dissociation (Kd) et du nombre de sites (N) récepteurs aux LDL sur les lignées lymphoblastiques.

Les cellules sont incubées pendant 2 heures à 4°C en présence d'une gamme de concentrations croissantes de ¹²⁵I-LDL.

La représentation de Scatchard permet de calculer le Kd et N.

M. F., souche normale

Iceland 4A, souche hétérozygote FH

Le tableau XXIII exprime les résultats obtenus après représentation de Scatchard.

La constante de dissociation (Kd) est assez différente d'une souche à une autre, surtout pour Mi. Y. où les récepteurs semblent avoir plus d'affinité pour les LDL.

Les cellules de Ma. Y. ont un nombre de sites récepteurs comparable à celui des cellules M. F. (souche normale). Par contre, les cellules de Mi. Y. ont un nombre de sites diminué de moitié, similaire à celui de la souche hétérozygote FH (Iceland 4A).

V.2.2. Immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C

Le tableau XXIV rapporte les résultats obtenus après deux incubations successives à 4°C avec des LDL et un anticorps anti-LDL puis révélation du complexe par un anticorps marqué à la fluorescéine (FITC-Ig).

20% des cellules, après incubation avec le FITC-Ig ont une fluorescence supérieure au seuil d'intensité déterminé pour l'appareil.

Après immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C, toutes les cellules sont fluorescentes. Cependant l'intensité de fluorescence est différente selon la souche étudiée. En effet, pour Ma. Y., le pic du maximum de cellules fluorescentes est décalé vers la droite donc vers les plus fortes intensités de fluorescence (Figure 12). Par rapport à Mi. Y., il y a donc plus de sites récepteurs des LDL à la surface de ces cellules.

Ma. Y. donne des résultats comparables à ceux de M. F. et EBV 82, qui sont les deux souches normales de référence. Mi. Y. donne des résultats identiques à la souche hétérozygote FH (Iceland 4A).

V.2.3. Fluorescence directe

L'autofluorescence (cellules incubées dans un milieu sans lipoprotéines fluorescentes) est comparable pour les deux lignées Ma. Y. et Mi. Y.. Le pic du maximum de cellules fluorescentes est à environ 70 sur l'échelle logarithmique de l'intensité de fluorescence.

Souche	Position du pic
EBV 82	165
M. F.	163
Iceland 4A	136
Ma. Y.	152
Mi. Y.	119

Tableau XXIV : Intensité de fluorescence des lignées lymphoblastiques après immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C (position du pic du maximum de cellules fluorescentes).

Les cellules sont incubées successivement avec des LDL, un anticorps anti-LDL puis le FITC-Ig.

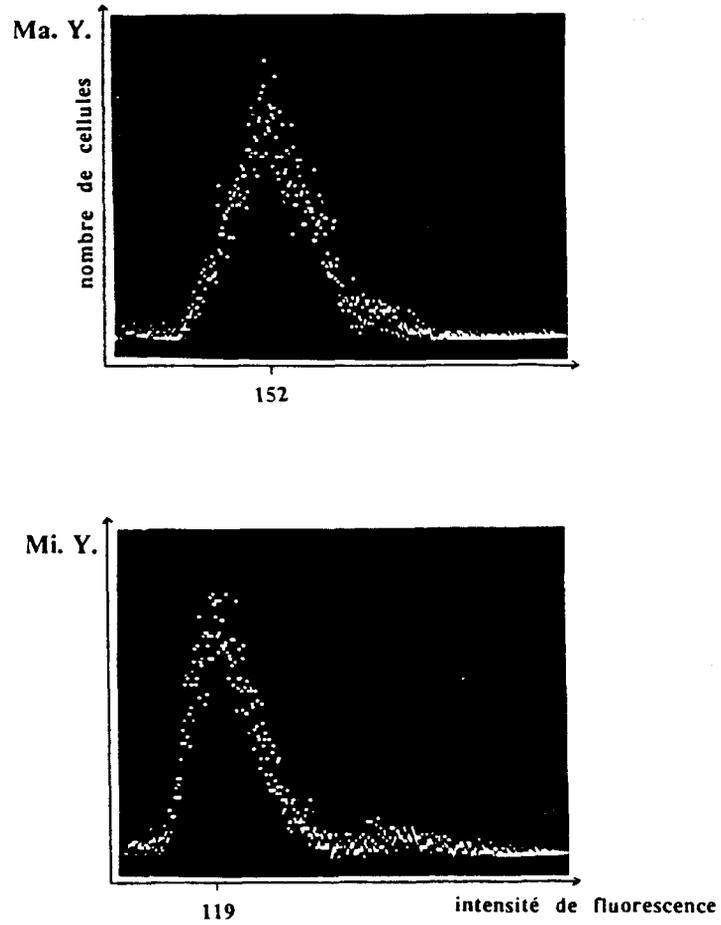


Figure 12 : Distribution de la fluorescence des lignées lymphoblastiques après immunocytofluorimétrie indirecte à 4°C.

En abscisse : intensité de fluorescence, échelle logarithmique, unités arbitraires.

En ordonnée : nombre de cellules.

Quand les cellules sont incubées en présence de DiI-LDL, elles fixent et internalisent les lipoprotéines (Figure 13). Le métabolisme des LDL est différent entre les deux souches étudiées. En effet, les cellules de Ma. Y. sont plus fluorescentes que les cellules de Mi. Y.. Elles ont donc fixé et internalisé plus de LDL (nous considérons que le marquage par le DiI est homogène pour toutes les lipoprotéines).

Quand les cellules sont incubées avec le DiI-LDL et un excès de LDL non marquées, leur fluorescence revient à une valeur très proche de leur autofluorescence (environ 90 sur l'échelle logarithmique).

Les résultats de Mi. Y. (Tableau XXV), bien que plus faibles que ceux de Ma. Y., restent cependant un peu supérieurs à ceux obtenus avec la souche hétérozygote FH.

V.3. Conclusion

Il apparaît donc que l'étude sur les cellules est tout à fait en accord avec l'étude génétique réalisée auprès de ces patients.

Mi. Y. présente une substitution d'une proline par une leucine en position 664 du récepteur LDL. Cette mutation dans le deuxième domaine du récepteur LDL (domaine d'homologie avec le précurseur de l'EGF) semble donc altérer fortement la fonction normale de cette protéine. En effet, trois techniques différentes ont permis de montrer que, pour cette lignée cellulaire, l'expression du récepteur LDL était fortement diminuée par rapport à des cellules normales, et qu'elle était comparable à celle observée pour une lignée hétérozygote FH confirmée (délétions des exons 9 et 10 du gène du récepteur LDL).

Ma. Y. ne présente aucune mutation sur le récepteur LDL. Son activité récepteur LDL est comparable à celle de cellules normales de référence. Son apoB ne présente pas la mutation 3500 conduisant à une élévation de la cholestérolémie (Weisgraber et al., 1988). Cependant ce sujet souffre d'une hypercholestérolémie isolée à 3,52 g/l sans élévation des triglycérides. L'hypercholestérolémie observée chez ce sujet ne semble donc pas liée directement à un défaut du récepteur LDL ou du ligand apoB.

Cette étude confirme qu'il est possible, par des techniques sur cellules, de diagnostiquer un défaut au niveau du récepteur LDL. L'étude génétique

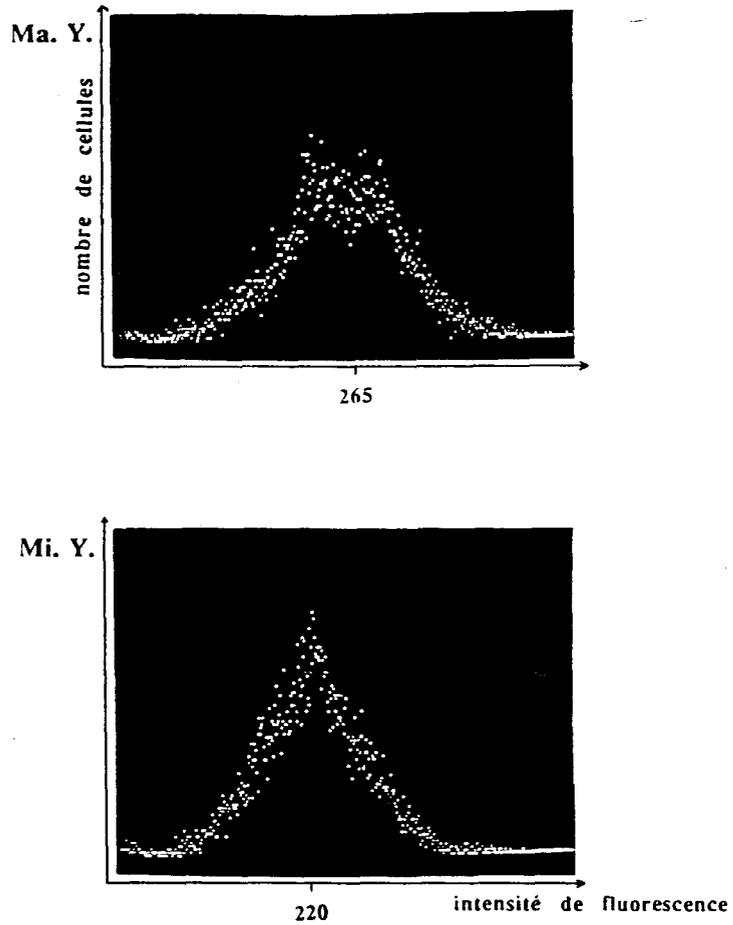


Figure 13 : Distribution de la fluorescence des lignées lymphoblastiques après incubation pendant 5 heures à 37°C en présence de DiI-LDL.

En abscisse : intensité de fluorescence, échelle logarithmique, unités arbitraires.

En ordonnée : nombre de cellules.

	Position du pic		
	Auto fluorescence	DiI-LDL	DiI-LDL + LDL
Iceland 4A	78	188	85
Ma. Y.	69	265	99
Mi. Y.	72	220	89

Tableau XXV : Intensité de fluorescence des lignées lymphoblastiques après incubation pendant 5 heures à 37°C avec des LDL fluorescentes (DiI-LDL).

Un témoin d'autofluorescence est réalisé par incubation des cellules sans DiI-LDL.

La fixation-internalisation non spécifique est évaluée par incubation des cellules avec les DiI-LDL et un excès de LDL non marquées.

permet de définir ce défaut en terme de modification de la séquence nucléotidique conduisant à une protéine altérée.

Cette étude montre aussi qu'il existe des hypercholestérolémies non liées au récepteur LDL ou à la mutation 3500 de l'apoB.

Dans un premier temps il faudra donc rechercher une éventuelle autre mutation que la mutation 3500 sur l'apoB.

Dans un deuxième temps, une étude approfondie du métabolisme lipidique de ces cellules pourrait révéler, dans certaines conditions physiologiques, des désordres au niveau de la régulation de ce métabolisme. L'hypercholestérolémie pourrait alors être due à un défaut d'expression du récepteur LDL *in vivo* par dysfonctionnement du système complexe de régulation.

CONCLUSION

Choix d'un modèle cellulaire pour l'étude de l'expression du récepteur LDL

La première partie de notre travail a consisté à appliquer les techniques d'étude de l'expression des récepteurs LDL cellulaires déjà décrites, à standardiser nos méthodes d'investigation, et à proposer de nouveaux protocoles d'étude.

Nous avons montré que deux souches cellulaires (lymphocytes, lymphoblastes ou fibroblastes) de deux individus différents ne peuvent être comparées, sur le plan de l'activité de leurs récepteurs LDL, que lorsqu'elles sont étudiées simultanément dans une même expérimentation, avec une même densité cellulaire de départ.

Nous avons très largement utilisé, sur les fibroblastes en culture obtenus à partir d'une biopsie de peau, une technique de fixation, internalisation et dégradation des ^{125}I -LDL.

Une technique de dosage des récepteurs LDL sur les lymphocytes a été mise au point dans notre laboratoire. La présence des récepteurs LDL à la surface des cellules est étudiée grâce à la fixation à 4°C de LDL ou d'un anticorps anti-récepteur LDL. Cette fixation est révélée par un anticorps fluorescent. Cette technique offre certains avantages par rapport à celle sur fibroblastes. En effet, les cellules sont obtenues par simple prélèvement de sang, les résultats sont disponibles après 72 heures de culture, la cytofluorimétrie de flux demeure moins dangereuse que l'utilisation de radioligands. Cependant, elle ne peut être reproduite sans un nouveau prélèvement et ne permet pas facilement une étude de l'internalisation du ligand.

La transformation des lymphocytes par le virus Epstein-Barr conduit à la culture de cellules devenues immortelles. Ces cultures de cellules permettent de réaliser un grand nombre d'expérimentations.

Les LDL fluorescentes peuvent être utilisées pour étudier l'expression à 37°C des récepteurs LDL de ces lymphocytes, prélevés chez des patients suspectés d'avoir une déficience du récepteur LDL.

Des techniques de radioligand peuvent être réalisées sur ces cellules en culture pour obtenir de plus amples informations (nombre de sites récepteur, constante de dissociation) et confirmer à 4°C les résultats obtenus à 37°C.

L'utilisation de telles lignées permet de combiner l'avantage d'un seul prélèvement sanguin et la possibilité de multiplier les expérimentations. Cependant, les conditions expérimentales de culture sont plus difficiles à contrôler que celles des fibroblastes. Ces conditions peuvent conduire à des différences importantes de croissance cellulaire, et donc à des différences d'expression des récepteurs LDL dépendante du milieu et non du génotype.

Le choix d'un type cellulaire devra donc prendre en compte les différents facteurs précédemment décrits et dépendra du type d'étude entreprise (étude individuelle, étude à long terme, étude de population...).

Etude clinique

Ces techniques nous ont permis de tester les récepteurs LDL dans des études familiales et des études de population.

- confirmation du génotype par l'étude fonctionnelle

Il est intéressant de noter que, dans une famille où l'analyse génétique a été réalisée, une mutation sur le gène du récepteur LDL (au niveau du codon de l'acide aminé 664) conduit à la traduction d'une protéine déficiente. Nous avons montré que chez le sujet portant cette mutation (hétérozygote pour la modification), l'activité des récepteurs LDL est diminuée de moitié par rapport à des cellules normales.

Il est donc indispensable que toute étude du gène du récepteur LDL soit confirmée par l'étude phénotypique. Cette dernière permet d'appréhender les modulations fonctionnelles engendrées par les modifications sur le gène

et donc d'en déduire de nombreuses informations sur les relations structure-fonction du récepteur LDL.

- Association entre les déficiences du ligand et celles du récepteur

L'étude de patients dont l'apoB présente la mutation 3500 montre que l'hypercholestérolémie qui en résulte et que le bilan lipidique élémentaire (cholestérol total et cholestérol des LDL, triglycérides) sont tout à fait comparables à ceux des patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale dans sa forme hétérozygote.

Nous avons montré aussi que le déficit en récepteurs LDL peut coexister avec la mutation 3500 de l'apoB sans pour autant modifier le bilan lipidique de base (cholestérol total, LDL-cholestérol, triglycérides).

Cependant, l'analyse d'un bilan plus complet chez ces patients (lipides, lipoprotéines et apolipoprotéines), est en projet dans notre laboratoire afin de déterminer s'il existe un profil lipidique caractéristique de ce type de perturbations.

Nous avons particulièrement étudié une famille (la famille M.) dont les membres sont hypercholestérolémiques (de plus le père est hypertriglycéridémique).

Nous avons observé une déficience du récepteur LDL qui ne semble pas aussi importante que dans le cas hétérozygote FH.

Différentes approches (étude sur trois types cellulaires, technique radio-immunologique avec des anticorps monoclonaux) montrent une anomalie des LDL de ces sujets qui pourrait être un autre facteur intervenant dans l'hypercholestérolémie.

Pour élucider la nature des déficits observés dans cette famille, il est devenu maintenant indispensable d'entreprendre des études sur les gènes de l'apoB et du récepteur LDL.

- hypercholestérolémies non liées au récepteur ni au ligand

Nos résultats montrent que le diagnostic d'hypercholestérolémie familiale peut être assuré, pour bon nombre de patients, de façon relativement fiable par les signes cliniques (xanthomes, arc cornéen, antécédents familiaux d'hypercholestérolémie ou de maladie cardiovasculaire) et par des données biologiques (bilan lipidique, lipoprotéinique et apolipoprotéinique).

Cependant nos travaux ont confirmé l'existence d'hypercholestérolémies non directement liées à un défaut génétique du récepteur LDL et conduisant à un même tableau clinique et biologique.

Des patients, dont le diagnostic clinique est similaire, présentent *in vitro* une expression des récepteurs LDL qui peut être normale, sans pour autant que cela influe sur la nature du traitement ou son efficacité.

Dans une population de 41 sujets classés par le diagnostic clinique comme hétérozygotes pour l'hypercholestérolémie familiale, 9 sujets ont des lymphocytes et des fibroblastes qui peuvent exprimer une activité normale des récepteurs LDL dans des conditions de dérégulation cellulaire (milieu de culture additionné de sérum sans lipoprotéines, milieu de culture additionné de SAB et de HDL₃ pour promouvoir l'efflux du cholestérol).

Ces sujets sont indiscernables de ceux présentant un déficit en récepteur LDL en ce qui concerne les signes cliniques, le bilan lipidique et son évolution après traitement sous fénofibrate ou simvastatine. Nous suggérons qu'*in vivo* leurs récepteurs LDL sont fortement inhibés. Une perturbation acquise ou génétique de la régulation de l'expression du récepteur LDL pourrait donc être à la base de l'hypercholestérolémie observée.

De nombreux effecteurs biologiques sont impliqués dans la régulation *in vivo* de la synthèse et de l'expression du récepteur LDL. Un certain nombre de changements physiologiques, liés à la croissance cellulaire et au contrôle hormonal, régulent la transcription du gène du récepteur LDL par des mécanismes ne dépendant pas seulement de variations du pool intracellulaire des stérols.

Il semble donc intéressant dans l'avenir d'étudier les effets de différents effecteurs physiologiques (hormones telles que insuline, triiodothyronine, oestrogènes ; AMPc ; facteurs de croissance cellulaire...) sur la régulation de la synthèse (dosage des mRNA et de la protéine) et l'expression du récepteur LDL chez les patients hypercholestérolémiques dont l'activité des récepteurs LDL est normale *in vitro*.

Si les études familiales sont possibles chez ces patients, nous pourrions regarder si les perturbations de la régulation éventuellement observées sont acquises ou génétiques. La présence de perturbations à caractère génétique expliquerait l'existence d'antécédents familiaux chez ces malades.

Par ces différents travaux nous montrons que les études de gènes doivent être associées à des études fonctionnelles. En effet, il apparaît essentiel de rechercher l'incidence d'une modification au niveau du gène sur la fonction de la protéine qui en résulte. Inversement, l'étude de la modulation de l'expression et de la fonction d'une protéine doit être associée à l'étude du gène de cette protéine.

C'est de cette manière, par des études réciproques "gène-fonction" et "fonction-gène", que nos connaissances sur les relations structure-fonction du récepteur LDL deviendront plus précises.

APPENDICE TECHNIQUE

Préparation des lipoprotéines et du sérum déficient en lipoprotéines par centrifugation séquentielle

Référence :

HAVEL R. J., EDER H. A., BRAGDON J. H.

The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.

J. Clin Invest., 1955, 34 : 1345-1353.

Principe :

L'isolement des fractions lipoprotéiniques est réalisé à partir du plasma de sujets sains par ultracentrifugations à 100 000 g à 4°C pendant 24 heures à des densités choisies de KBr.

Mode opératoire :

Pour les LDL (densité 1,030-1,053), la densité du plasma (1,006) est ajustée à 1,030 par addition de KBr solide (3,54 g/100 ml de plasma). Après une première centrifugation, le surnageant est lavé par une solution de densité 1,030. Après une deuxième centrifugation, la densité du surnageant est ajustée à 1,053 (3,43 g KBr/100 ml). Deux ultracentrifugations à cette même densité nous permettent de recueillir le surnageant purifié en LDL.

Pour les HDL₃ (densité 1,120-1,210), le protocole est identique au précédent, aux densités 1,120 puis 1,210.

Les lipoprotéines sont ensuite dialysées contre un tampon PBS (phosphate 0,01 M, NaCl 0,15 M, Na₂ EDTA 0,1 g/l pH 7,2).

Les lipoprotéines sont ensuite filtrées stérilement sur filtre millipore 0,22 µm et conservées pendant 3 à 4 semaines à 4°C.

Le sérum déficient en lipoprotéines de densité > 1,25 est préparé à partir de sérum de veau foetal. Après deux ultracentrifugations à la densité de 1,25, le sérum est dialysé contre un tampon NaCl 0,15M pH 7,2 puis décomplémenté par incubation à 56°C pendant 1/2 heure. Après ajustement de la concentration protéique à 40 g/l, le sérum est filtré stérilement puis congelé à -20°C.

Dosage des protéines

Référence :

PETERSEN G. L.

A simplification of the protein assay method of Lowry which is more generally applicated.

Anal. Biochem. 1977, 83 : 346-356.

Principe :

La méthode de Petersen est un dosage colorimétrique adapté de la méthode de Lowry, utilisant le SDS comme détergent pour les molécules liposolubles composant les lipoprotéines. La sérualbumine (de 0 à 1 mg/ml) est utilisée comme étalon.

Réactifs :

Réactif 1 : carbonate de sodium Na_2CO_3 à 20%

Réactif 2 : 0,5 g de Sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ + 1 g de Tartrate de Sodium et de Potassium $\text{C}_4\text{H}_4\text{NaO}_6, 4\text{H}_2\text{O}$ (qsp 250 ml H_2O)

Réactif 3 : Hydroxyde de sodium NaOH 0,8 N

Réactif 4 : H_2O

Réactif 5 : SDS à 10%

Le mélange réactionnel est préparé à partir des solutions précédentes :
0,5 vol de 1 + 0,5 vol de 2 + 1 vol de 3 + 1 vol de 4 + 1 vol de 5

Réactif de Folin

Mode opératoire :

A 100 μl de solution à doser est ajouté 1 ml de mélange réactionnel. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, on ajoute 0,5 ml de réactif de Folin dilué au 1/6. Après incubation des échantillons et de la gamme étalon pendant 30 minutes à l'obscurité, la lecture de l'absorbance se fait à 750 nm.

Acétylation des LDL

Référence :

BASU S. K., GOLDSTEIN J. M., ANDERSON R. G. W., BROWN M. S.

Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73 : 3178-3182.

Principe :

Les LDL sont modifiées chimiquement au niveau des protéines par l'anhydride acétique. Ce composé réagit sur les fonctions amines libres, notamment celles en position epsilon des résidus lysine, pour former une liaison amide.

L'acétylation augmente la charge globale négative des LDL. Elles ne sont plus reconnues par le récepteur B, E ou récepteur LDL.

Réactifs :

Anhydride acétique

Acétate de sodium saturé

Solution NaCl 0,15 M, Na₂ EDTA 0,3 mM pH 7,4

Mode opératoire :

Les LDL, dont la concentration est de 2 à 5 mg protéines/ml dans la solution NaCl-EDTA, sont diluées volume à volume dans l'acétate de sodium saturé.

6 aliquots de 1,5 à 2 µl d'anhydride acétique sont ajoutés à 0°C sous agitation douce à des intervalles de 15 minutes.

Le mélange réactionnel est ensuite déposé sur une colonne de gel Sephadex G25 (PD-10 Pharmacia).

Les LDL acétylées sont éluées avec la solution NaCl-EDTA puis dialysées contre cette même solution à 4°C. Elles sont ensuite filtrées stérilement et la concentration en protéines est déterminée par la méthode de Petersen.

Analyse des lipoprotéines en gel de polyacrylamide

Référence :

Cette technique est commercialisée par la firme SEBIA sous le nom de LIPOFILM.

Principe :

Les lipoprotéines sont soumises à une séparation électrophorétique en gel de polyacrylamide en gradient discontinu. Le support est constitué de 2 gels de polyacrylamide de concentrations différentes :

- gel à 2% dans la partie supérieure où se trouvent les puits de dépôt,
- gel à 3% dans la partie inférieure.

Les chylomicrons qui sont de très grosses molécules resteront dans les puits de dépôt, tandis que les autres lipoprotéines migreront sous l'action du champ électrique. Le premier gel à 2% arrêtera les VLDL tandis que le second gel assurera la séparation des lipoprotéines de plus haute densité.

Réactifs :

Tampon lipofilm concentré à diluer dans un litre
Film hydraté avec support rigide
Colorant noir soudan

Mode opératoire :

A un volume de noir soudan (50 µl) est ajouté 1 volume d'échantillon à analyser (50 µl). Après agitation et incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, 5 µl d'échantillon pré-coloré sont déposés dans les puits de dépôt. Le temps de migration est de 60 à 80 minutes sous une tension de 250 V (8 mA par film).

Le gel peut être conservé séché après un lavage d'une heure dans 5% d'acide acétique et 2% d'éthylène glycol en eau déminéralisée.

Marquage des LDL à l'Iode ^{125}I

Référence :

BILHEIMER D. W., EISENBERG S., LEVY R. I.
The metabolism of very low density lipoproteins.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 260 : 212-221.

Principe :

L'oxydation en milieu alcalin, en présence de monochlorure d'iode, permet la fixation de l'iode ^{125}I sur le noyau aromatique des résidus de tyrosine, en position ortho du groupement hydroxyle.

Réactifs :

LDL à 2 mg prot/ml dialysées contre du PBS 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 g/l, pH 7,2

Tampon Tris 1 mM, NaCl 0,15 M, Na₂ EDTA 0,2 g/l pH 7,2-7,4

Tampon glycine-NaCl :

glycine 1 M

NaCl 1 M

pH 9,6

Solution d'ICI 0,033 M en NaCl 1 M, HCl 1 M préparée à partir d'une solution-mère à 0,33 M conservée à l'obscurité

Iodure de Sodium $^{125}\text{I-Na}$ (10 mCi/100 μl Amersham)

Mode opératoire :

Le marquage est réalisé sous hotte aspirante à charbon actif.

Les solutions A et B suivantes sont préparées extemporanément.

Solution A : 1 ml LDL

0,2 ml tampon glycine-NaCl

Solution B : 0,2 ml tampon glycine-NaCl

10 μl ICI

10 μl $^{125}\text{I-Na}$

La solution B est transférée dans le tube contenant la solution A.

Le mélange de ces 2 solutions est déposé sur une colonne de gel Sephadex G25 (PD10 Pharmacia) équilibrée en tampon Tris NaCl-Na₂ EDTA.

Le filtrat est recueilli par fraction de 15 gouttes. La radioactivité de 1 µl de chaque fraction est comptée.

Les fractions contenant les LDL marquées à l'Iode ¹²⁵I sont rassemblées. Les protéines sont dosées et la radioactivité mesurée. L'activité spécifique varie de 250 à 500 cpm/ng protéines.

Préparation des lipoprotéines fluorescentes

Référence :

Lipoprotein labeling with the fluorescent probe DiI.
Methods in Enzymology, Volume 129 : 562-565.

Principe :

Le DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) est incorporé dans les lipoprotéines de façon similaire aux phospholipides, c'est-à-dire avec les groupements polaires à la surface des lipoprotéines.

Réactif :

DiI à 3 mg/ml dans le DMSO
LPDS densité > 1,21
solution NaCl 0,15 M, Na₂ EDTA 0,1 g/l, pH 7,2-7,4
Lipoprotéines (1 à 2 mg/ml) dialysées contre la solution NaCl-Na₂ EDTA

Mode opératoire :

2 ml de LPDS sont ajoutés à 1 mg de lipoprotéines à marquer.
La solution est agitée doucement et 50 µl de DiI sont ajoutés par mg de lipoprotéines. Le mélange est incubé pendant 8 à 15 heures à 37°C. Les LDL marquées au DiI (DiI-LDL) sont colorées en rose.
Les lipoprotéines sont ensuite réisolées par ultracentrifugation à une densité de 1,063 pour les LDL, en ajoutant 0,0834 g de KBr par ml de milieu d'incubation.
Après centrifugation, les lipoprotéines marquées sont dialysées contre la solution NaCl-Na₂ EDTA, filtrées stérilement sur filtre 0,22 µm, et la concentration en protéines est déterminée par la méthode de Petersen.
L'excitation optimale du DiI est obtenue à 520 nm. L'émission maximale de fluorescence est observée à 570 nm.
Le DiI incorporé dans les lipoprotéines ne se transfère pas facilement aux autres lipoprotéines non marquées, ni aux membranes cellulaires.

Le DiI s'accumule dans les cellules et n'est pas relargué dans le milieu quand les LDL sont dégradées. Contrairement à la fluorescéine, il n'y a pas de quenching quand le DiI est intracellulaire.

Milieux de culture

PBS 0,01 M - NaCl 0,15 M

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	2,87 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Eau déminéralisée qsp	1 l
pH	7,2 - 7,4
Filtration stérile sur filtre 0,45 µm.	

Puck - EDTA - NaCl 0,15 M

NaCl	8 g
KCl	0,4 g
NaHCO ₃	0,3 g
EDTA	0,2 g
Eau déminéralisée qsp	1 l
pH	7,2 - 7,4
Filtration stérile sur filtre 0,45 µm.	

DMEM

DMEM	66,6 g
Pénicilline 10 000 U/ml) 10 ml
Streptomycine 1 000 µg/ml)
Bicarbonate de sodium à 5,6%	180 ml
Eau déminéralisée qsp	5 l
pH	7,2 - 7,4
Filtration stérile sur filtre 0,45 µm.	

RPMI

RPMI	10,43 g
Pénicilline-Streptomycine	2 ml
Bicarbonate de sodium	30 ml
Eau déminéralisée qsp	1 l
pH	7,2 - 7,4

Filtration stérile sur filtre 0,45 µm

Le sérum de veau foetal (SVF) est décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes.

DMEM Complet (fibroblastes et cellules HeLa)

Milieu DMEM	445 ml
SVF	50 ml
Glutamine 3%	5 ml
Gentamycine 10 mg/ml	2 ml
Fungizone 5 mg/ml	250 µl

RPMI Complet (lymphoblastes)

Milieu RPMI	445 ml
SVF	50 ml
Glutamine 3 %	5 ml

Culture des fibroblastes humains à partir d'une biopsie de peau

Principe :

La culture primaire des fibroblastes humains est réalisée à partir d'une biopsie de peau.

Les cellules à confluence sont ensuite dissociées enzymatiquement et réensemencées sur une surface de culture plus importante.

Réactifs :

Milieu DMEM

Milieu DMEM complet

Puck-EDTA

Trypsine 0,05%-EDTA 0,02% dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}

Mode opératoire :

La biopsie de peau est réalisée de façon aseptique sur la face interne du bras. Elle est lavée plusieurs fois dans un milieu DMEM. A l'aide de deux scalpels, des petits morceaux sont découpés et déposés dans un petit flacon de culture (25 cm²) ; 2 à 3 ml de milieu DMEM complet sont alors ajoutés.

Pendant 3 jours, le flacon de culture n'est pas bougé pour permettre l'adhésion de la biopsie sur le plastique du flacon.

Le milieu de culture est changé 2 fois par semaine par du milieu DMEM complet.

Lorsqu'on a obtenu des zones où les cellules sont très confluentes, on peut procéder au "1^{er} passage". Après lavage des cellules au Puck-EDTA, on fait agir pendant 5 minutes à 37°C 1 ml de trypsine. L'action de la trypsine est arrêtée par 3 ml de milieu DMEM complet. On transfère le tout dans un grand flacon de culture (80 cm²) contenant 15 ml de milieu DMEM complet.

Deux fois par semaine, le milieu est remplacé par 15 ml de milieu DMEM complet neuf.

Pour les passages suivants, on procède comme précédemment à partir d'une culture de cellules confluentes que l'on transfère sur une surface triple (passage tous les 15 à 18 jours).

Culture des cellules HeLa

Principe :

Les cellules sont dissociées enzymatiquement et réensemencées sur une surface plus importante.

Réactifs :

Milieu DMEM complet

Puck EDTA

Trypsine-EDTA

Mode opératoire :

Les cellules HeLa Williams sont une lignée de cellules provenant d'un cancer humain de l'utérus.

Le milieu d'une culture confluite de cellules HeLa est aspiré et la culture est lavée par 15 ml de Puck-EDTA. On ajoute 1 ml de trypsine-EDTA qui provoque une immédiate dissociation cellulaire. L'action de la trypsine est arrêtée par 5 ml de milieu DMEM complet. Les cellules sont remises en suspension par aspiration et refoulement puis ensemencées sur une surface de culture plus importante. Le temps de doublement est de 24 heures environ.

Isolement des cellules mononucléaires sanguines

Référence :

BOYÛM A.

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.

Scand. J. Clin. Invest., 1968, 97 : 77-89.

Réactifs :

Sang recueilli dans des tubes contenant du citrate de sodium tamponné à 3,8%

Solution de lymphoprep : metrizoate de sodium/ficoll

NaCl 0,15 M pH 7,2-7,4

PBS 0,01 M, NaCl 0,15 M pH 7,2-7,4

Milieu RPMI

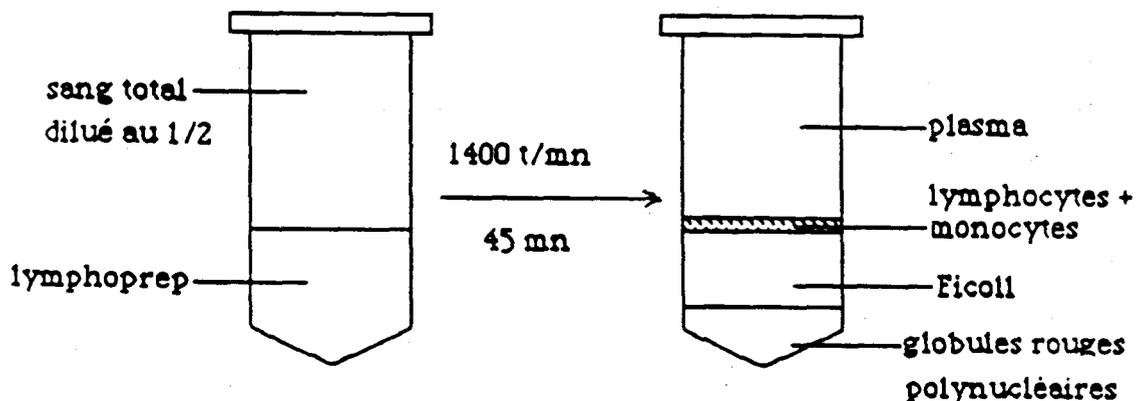
Milieu RPMI/SAB : milieu RPMI auquel sont ajoutés 10 g/l de SAB

Mode opératoire :

L'isolement des cellules mononucléaires sanguines se réalise stérilement à température ambiante.

Le sang est dilué volume à volume dans NaCl 0,15 M. 20 ml de sang dilué sont déposés sur 10 ml de lymphoprep dans un tube conique et centrifugés pendant 45 minutes à 20°C à 1400 t/mn.

L'interphase contenant les cellules mononucléaires est collectée.



La suspension cellulaire est lavée une fois par du PBS 0,01 M et deux fois par du RPMI (centrifugations à 1400 t/mn pendant 10 minutes).

- Isolement des lymphocytes :

Les cellules sont mises en culture dans le milieu RPMI/SAB à raison de $2 \cdot 10^6$ cellules par ml.

Les monocytes adhèrent à la surface plastique de la boîte de culture et ne sont pas pris lors de la préparation des cellules pour un test.

- Isolement des monocytes :

Les cellules sont mises en culture dans le milieu RPMI contenant 20% de sérum humain à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules par ml.

Après 2 heures à 37°C, les monocytes ont adhéré à la surface de la boîte de culture. Les lymphocytes en suspension sont éliminés. La culture est lavée par du milieu RPMI.

Du milieu complet (RPMI + sérum humain) est ajouté. Le milieu est changé une fois par semaine.

**Etude de la fixation, de l'internalisation et de la
dégradation des lipoprotéines radiomarquées
par les cellules en culture monocouche**

Référence :

GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S.

Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts : comparison of cells from a normal and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia.

J. Biol. Chem., 1974, 249 : 5153-5162.

Mode opératoire :

- Stimulation des récepteurs LDL cellulaires :

Les cellules (70 000 pour les fibroblastes, 50 000 pour les cellules HeLa) sont cultivées en milieu DMEM complet dans des puits de 3,5 cm de diamètre.

48 heures avant l'étude (les cellules sont presque confluentes), le milieu est éliminé. Les cellules sont incubées en milieu DMEM/Glutamine contenant 10% de LPDS afin d'activer la synthèse des récepteurs LDL.

Des puits sans cellules sont incubés avec le milieu LPDS pendant 48 heures, afin de déterminer la fixation et la dégradation non spécifiques sur plastique.

- Etude de la fixation à 4°C :

Après refroidissement des cellules à 4°C, le milieu de culture est éliminé.

Les cellules sont incubées pendant 2 heures à 4°C avec 0,7 ml de DMEM/LPDS contenant les lipoprotéines marquées à l'Iode ¹²⁵I seules (fixation totale) ou en présence d'un excès de lipoprotéines non marquées (fixation non spécifique).

Les lipoprotéines non fixées après incubation sont éliminées par 9 lavages successifs (3 ml par lavage) avec les tampons :

- 3 lavages avec le tampon NaCl 0,15 M, Tris 20 mM, pH 7,2-7,4,
- 3 lavages avec le tampon NaCl, Tris, SAB 0,2%,
- 3 lavages avec le tampon NaCl, Tris.

Pendant les lavages, les cellules et les tampons sont gardés à 4°C sur un lit de glace.

Les cellules sont dissoutes par de la soude 0.1 N :

- 0,5 ml pour les fibroblastes,
- 1 ml pour les cellules HeLa.

La radioactivité est mesurée et les protéines cellulaires sont dosées par la méthode de Petersen sur un aliquote de 100 µl :

- 100 à 200 µg protéines par puits pour les fibroblastes,
- 400 à 600 µg protéines par puits pour les cellules HeLa.

Après soustraction du bruit de fond (radioactivité associée aux puits sans cellules), la fixation est évaluée en ng de lipoprotéines fixées par mg de protéines cellulaires.

- Etude de la fixation et internalisation à 37°C :

Les cellules sont incubées pendant 4 heures à 37°C selon le protocole décrit précédemment.

Le surnageant de cette incubation est conservé pour l'étude de la dégradation.

Les cellules sont refroidies à 4°C et lavées comme précédemment.

La radioactivité mesurée correspond aux lipoprotéines fixées à la surface cellulaire et internalisées.

Les résultats sont exprimés en ng de lipoprotéines fixées et internalisées par mg de protéines cellulaires.

- Etude de la dégradation :

Après 4 heures d'incubation à 37°C, les surnageants cellulaires (0,7 ml) sont prélevés.

Les protéines sont précipitées par 0,175 ml d'acide trichloracétique à 50% pendant 1 heure à 4°C. Cette étape précipite toutes les lipoprotéines radiomarquées ni fixées, ni incorporées par les cellules.

Après centrifugation à 2000 t/mn pendant 10 minutes, 0,375 ml de surnageant sont prélevés, stockés dans des tubes en verre et additionnés de 10 µl d'iodure de potassium à 40% et de 10 µl d'H₂O₂ à 30%. 0,7 ml de chloroforme sont alors ajoutés. L'Iode libre est ainsi éliminé par oxydation et extraction chloroformique. La radioactivité est comptée sur 0,175 ml du surnageant aqueux.

Les puits sans cellules permettent de soustraire la radioactivité correspondant à la dégradation spontanée des lipoprotéines.

La dégradation est exprimée en ng de lipoprotéines dégradées par mg de protéines cellulaires.

Mesure de la fixation à 4°C des LDL sur cellules en suspension par immunofluorescence indirecte

Référence :

BENHAMAMOUCH S., KUSNIERZ J.-P., AGNANI G., MARZIN D., LECERF J.-M., FRUCHART J.-C., CLAVEY V.

Determination of the LDL receptor binding capacity of human lymphocytes by immunocytofluorimetric assay.

Biochem. Biophys. Acta, 1988, 1002 : 45-53.

Principe :

La fixation des LDL sur les cellules est suivie d'une incubation avec des anticorps anti-LDL de lapin. Le complexe est révélé par incubation avec des anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC-Ig Diagnostics PASTEUR).

Les cellules sont ensuite analysées par cytofluorimétrie de flux.

Mode opératoire :

La synthèse des récepteurs LDL est stimulée en incubant les cellules dans un milieu ne contenant pas les lipoprotéines apportant le cholestérol.

Les lymphocytes fraîchement isolés sont incubés pendant 72 heures dans un milieu RPMI additionné de 10 g/l SAB et de 0,300 g/l HDL₃ pour promouvoir l'efflux du cholestérol (Oram et al., 1981).

Les lymphocytes sont centrifugés à 1400 t/mn pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est lavé deux fois par du PBS contenant 20 g/l de SAB et CaCl₂ 0,5 mM (tampon C).

Les cellules sont mises en suspension dans le tampon C à la concentration finale de $30 \cdot 10^6$ cellules/ml. 75 µl de la suspension cellulaire sont incubés avec 25 µl de LDL à 100 µg/ml pendant 45 minutes à 4°C dans des tubes microfuges de polyéthylène.

Les cellules sont centrifugées à 8000 t/mn pendant 2 minutes, lavées avec 300 µl de tampon C puis recentrifugées pendant 1 minute.

Les cellules sont remises en suspension dans 75 μ l de tampon C et 65 μ l sont déposés sur 300 μ l de sérum de veau foetal.

Après centrifugation à 8000 t/mn pendant 5 minutes et lavage par 300 μ l de tampon C, les cellules sont incubées pendant 45 minutes à 4°C avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-LDL humaines à 50 μ g/ml dans un volume final de 100 μ l.

Après centrifugation à 5000 t/mn pendant 5 minutes, les complexes sont mis en présence du FITC-Ig (PASTEUR Diagnostic) dilué au 1/20, dans un volume final de 100 μ l pendant 45 minutes à 4°C.

Après un lavage au tampon C puis au PBS 0,01 M, les cellules sont fixées par 200 μ l de paraformaldéhyde à 1% dans du PBS 0,01 M et analysées en cytofluorimétrie de flux.

L'excitation de la fluorescéine est obtenue par le laser ion-argon à 488 nm.

Un deuxième laser, hélium-néon, permet de définir une fenêtre de cellules bien homogènes.

L'émission de la fluorescéine est observée entre 520 et 540 nm.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

AALTO-SETÄLÄ K., GYLLING H., HELVE E., KOVANEN P., MIETTINEN T. A.,
TURTOLA H., KONTULA K.

Genetic polymorphism of apolipoprotein B gene locus influences serum LDL
cholesterol level in familial hypercholesterolemia.

Hum. Genet., 1989a, 82 : 305-307.

AALTO-SETÄLÄ K., HELVE E., KOVANEN P. T., KONTULA K.

Finnish type of low density lipoprotein receptor gene mutation (FH-
Helsinki) deletes exons encoding the carboxy-terminal part of the receptor
and creates an internalization defective phenotype.

J. Clin. Invest., 1989b, 84 : 499-505.

AGNANI G.

Interaction de ligands du récepteur LDL avec différents types cellulaires.

Doctorat d'Université en Sciences Pharmaceutiques - Université de Lille II -
23 Octobre 1989.

AGNANI G., DELPIERRE C., BENHAMAMOUCH S., TORPIER G., CACHERA C.,
KOFFIGAN M., TARTAR A., FRUCHART J.-C., CLAVEY V.

Antipeptide antibody against the human low density lipoprotein receptor.
Characterization and cross-reactivity with bovine lymphocytes.

Biochem. J., 1989, 263 : 753-760.

ALAUPOVIC P.

Conceptuel development of the classification systems of plasma lipoproteins.

Prot. Biol. Fluids Proc. Colloq., 1972, 19 : 9-12.

ALBERTS A. W., CHEN J., KURON G., HUNT V., HUFF J., HOFFMAN C., ROTHROCK J.,
LOPEZ M., JOSHUA H., HARRIS E., PATCHETT A., MONAGHAN R., CURRIE S.,
STAPLEY E., ALBERS-SCHONBERG G., HENSEUS O., HIRSCHFIELD J., HOOGSTEIN
K., LIESH J., SPRINGER J.

Mevinolin : a highly potent competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-
methylglutaryl Coenzyme A reductase and a cholesterol lowering agent.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77 : 3957-3961.

ARAD Y., RAMAKRISHNAN R., GINSBERG H. N.

Lovastatin therapy reduces low density lipoprotein apoB levels in subjects
with combined hyperlipidemia by reducing the production of apoB

containing lipoproteins : implications for the pathophysiology of apoB production.

J. Lipid Res., 1990, 30 : 567-582.

AULINSKAS T. H., ORAM. J. F., BIERMAN E. L., COETZEE G. A., GEVERS W., VAN DER WESTHUYZEN D. R.

Retro-endocytosis of low density lipoprotein by cultured human skin fibroblasts.

Arteriosclerosis, 1985, 5 : 45-54.

AUWERX J. H., CHAIT A., DEEB S. S.

Regulation of the low density lipoprotein receptor and hydroxymethylglutaryl Coenzyme A reductase genes by protein kinase C and a putative negative regulatory protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989a, 86 : 1133-1137.

AUWERX J. H., CHAIT A., WOLFBAUER G., DEEB S. S.

Involvement of second messengers in regulation of the low density lipoprotein receptor gene.

Molecular and Cellular Biology, 1989b, 9 : 2298-2302.

AVIRAM M., BIERMAN E. L., ORAM J. F.

High density lipoprotein stimulates sterol translocation between intracellular and plasma membrane pools in human monocyte-derived macrophages.

J. Lipid Res., 1989, 30 : 65-76.

BACHS O., CARAFOLIE.

Calmodulin and calmodulin-binding proteins in liver cell nuclei.

J. Biol. Chem., 1987, 262 : 10786-10790.

BAMBERGER M. J., LANE M. D.

Possible role of the Golgi apparatus in the assembly of very low density lipoprotein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87 : 2390-2394.

BANOME A., GRUNDY S. M.

Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels.
N. Engl. J. Med., 1988, 318 : 1244-1248.

BARAK L. S., WEBB W. W.

Fluorescent low density lipoprotein for observation of dynamics of individual receptor complexes on cultured human fibroblasts.
J. Cell. Biol., 1981, 90 : 595-604.

BARD J.-M., PARRA H.-J., DOUSTE-BLAZY P., FRUCHART J.-C.

Effect of pravastatin, an HMG CoA reductase inhibitor, and cholestyramine, a bile acid sequestrant, on lipoprotein particles defined by their apolipoprotein composition.
Metabolism, 1990, 39 : 269-273.

BARNI N., TALMUD P., CARLSSON P., AZOULAY M., DARNFORS C., HARDING D., WEIL D., GRZESCHIK K. H., BJURSELL G., JUNIEN C., WILLIAMSON R., HUMPHRIES S. E.

The isolation of genomic recombinants for the human apolipoprotein B gene, and the mapping of the three common DNA polymorphisms of the gene - a useful marker for human chromosome 2.
Hum. Genet., 1986, 73 : 313-319.

BASU S. K., GOLDSTEIN J. L., ANDERSON R. G. W., BROWN M. S.

Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73 : 3178-3182.

BASU S. K., GOLDSTEIN J. L., ANDERSON R. G. W., BROWN M. S.

Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts.
Cell, 1981, 24 : 493-502.

BEAUMONT J. L., CARLSON L. A., COOPER G. R., FEJFAR Z., FREDRICKSON D. S., STRASSER T.

Classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias.
Bull. WHO., 1971, 43 : 891-915.

BEHRMAN R. G., WYNN V.

Low density lipoprotein metabolism by cultured human fibroblasts : relationship with aging and atherosclerosis.

Gerontology, 1984, 30 : 359-364.

BEISIEGEL U., SCHNEIDER W. J., GOLDSTEIN J. L., ANDERSON R. G. W., BROWN M. S.

Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia.

J. Biol. Chem., 1981, 256 : 11923-11931.

BEISIEGEL U., WEBER W., IHRKE G., HERZ J., STANLEY K. K.

The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein.

Nature, 1989, 341 : 162-164.

BENHAMAMOUCH S.

Le récepteur des LDL : dosage par immunocytofluorométrie indirecte. "Applications cliniques".

Doctorat d'Etat es Sciences Naturelles - Université d'Oran, Algérie - 11 Septembre 1988.

BENHAMAMOUCH S., KUSNIERZ J.-P., AGNANI G., MARZIN D., LECERF J.-M., FRUCHART J.-C., CLAVEY V.

Determination of the LDL receptor binding capacity of human lymphocytes by immunocytofluorimetric assay.

Biochim. Biophys. Acta, 1988, 1002 : 45-53.

BERG K. A., BERRY M. L., SAPARETO S. A., PETTY H. R.

Fluorescent studies of macrophage recognition and endocytosis of native and acetylated low density lipoprotein.

Biochim. Biophys. Acta, 1986a, 887 : 304-314.

BERG K., POWELL L. M., WALLIS S. C., PEASE R., KNOTT T. J., SCOTT J.

Genetic linkage between the Ag antigenic variation and the apolipoprotein B gene : assignment of the Ag locus.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986b, 83 : 7367-7370.

BEYNEN A. C., KATAN M. B.

Reproductibility of the variations between humans in the response of serum cholesterol to cessation of egg consumption.

Atherosclerosis, 1985, 57 : 19-31.

BILHEIMER D. W., EISENBERG S., LEVY R. I.

The metabolism of very low density lipoproteins.

Biochim. Biophys. Acta, 1972, 260 : 212-221.

BILHEIMER D. W., GRUNDY S. M., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

Mevinolin and colestipol stimulate receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80 : 4124-4128.

BILHEIMER D. W., HO Y. K., BROWN M. S., ANDERSON R. G. W., GOLDSTEIN J. L.

Genetics of the low density lipoprotein receptor.

Diminished receptor activity in lymphocytes from heterozygotes with familial hypercholesterolemia.

J. Clin. Invest., 1978, 61 : 678-696.

BLENE G. F., BOGAIEVSKI Y., BONNEFOUS F.

Fenofibrate : influence on circulating lipids and side effects in medium and long-term clinical use.

Pharmacological control of hyperlipidemia, J. R. Prous Science Publishers, Barcelona, 1986, 187-216.

BLUMBERG B. S., DRAY S., ROBINSON J. C.

Antigen polymorphism of low density beta-lipoprotein.

Allotopy in human serum.

Nature, 1962, 194 : 656-658.

BOERWINCKLE E., XIONG W., FOUREST E., CHAN L.

Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction : application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86 : 212-216.

BOREN J., WETTESTEN M., SJÖBERG A., THORLIN T., BONJERS G., WIKLUND O., OLOFSSON S.-O.

The assembly and secretion of apoB-100 containing lipoproteins in HepG2 cells.

J. Biol. Chem., 1990, 265 : 10556-10564.

BOYÛMA.

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.

Scand. J. Clin. Invest., 1968, 97 : 77-89.

BROWN M. S., ANDERSON R. G. W., GOLDSTEIN J. L.

Recycling receptors : the round-trip itinerary of migrant membrane proteins.

Cell, 1983, 32 : 663-667.

BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

Familial hypercholesterolemia : genetic, biochemical and pathophysiologic considerations.

Adv. Intern. Med., 1975, 20 : 273-296.

BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

Familial hypercholesterolemia : a genetic defect in the low density lipoprotein receptor.

N. Engl. J. Med., 1976, 294 : 1386-1390.

BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth.

J. Lipid Res., 1980, 21 : 505-517.

BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

Lipoprotein metabolism in the macrophage : implications for cholesterol deposition in atherosclerosis.

Ann. Rev. Biochem., 1983, 52 : 223-261.

BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.

Science, 1986, 232 : 34-47.

BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

Scavenging for receptors.

Nature, 1990, 343 : 508-509.

BÜTLER R., BRUNNER E., MORTANTI G.

Contribution of the inheritance of the Ag groups.

Vox Sang., 1974, 26 : 485-496.

CASCIOLA L. A. F., GRANT K. I., GEVERS W., COETZEE G. A., VAN DER WESTHUYZEN D. R.

Low density lipoprotein receptors in human fibroblasts are not degraded in lysosomes.

Biochem. J., 1989, 262 : 681-683.

CHAIT A., BIERMAN E., ALBERS J. J.

Regulatory role of triiodothyronine in the degradation of low density lipoprotein by cultured human skin fibroblasts.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1979, 48 : 887-889.

CHANG T.-Y., LIMANEK J. S.

Regulation of cytosolic acetoacetyl Coenzyme A thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase, and mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25-hydroxycholesterol in chinese hamster ovary cells.

J. Biol. Chem., 1980, 255 : 7787-7795.

CHAO Y. S., WINDLER E. E., CHEN G. C., HAVEL R. J.

Hepatic catabolism of rat and human lipoproteins in rats treated with 17 alpha-ethinyl estradiol.

J. Biol. Chem., 1979, 254 : 11360-11366.

CHEN G. C., ZHU S., HARDMAN D. A., SCHILLING J. W., LAU K., KANE J. P.

Structural domains of human apolipoprotein B-100.

Differential accessibility to limited proteolysis of apoB-100 in low density and very low density lipoproteins.

J. Biol. Chem., 1989, 264 : 14369-14375.

CHEN W.-J., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S.

NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalisation of the low density lipoprotein receptor.

J. Biol. Chem., 1990, 265 : 3116-3123.

CIANFLONE K. M., KWITEROVICH P. O., WALSH M., FORSE A., RODRIGUEZ M. A., SNIDERMAN A. D.

Stimulation of fatty acid uptake and triglyceride synthesis in human cultured skin fibroblasts and adipocytes by a serum protein.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 144 : 94-100.

CIANFLONE K. M., MASLOWSKA M. H., SNIDERMAN A. D.

Impaired response of fibroblasts from patients with hyperapobetalipoproteinemia to acylation-stimulating protein.

J. Clin. Invest., 1990, 85 : 722-730.

CLARKE P. R., HARDIE D. G.

Calmodulin-dependent multiprotein kinase and protein kinase C phosphorylate the same site on HMG CoA reductase as the AMP-activated protein kinase.

FEBS Lett., 1990, 269 : 213-217.

CLOUET E., PARIS R.

Triglycerides synthesis and oleic acid catabolism by hepatic microsomes and mitochondria in clofibrate or procetofen-treated rats.

Reprod. Nutr. Dev., 1980, 20 : 637-645.

CUMMINGS R. D., KORNFELD S., SCHNEIDER W. J., HOBGOOD K. K., TOLLESHAUG H.

Biosynthesis of the N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor.

J. Biol. Chem., 1983, 258 : 15261-15273.

CUTHBERT J. A., LIPSKY P. E.

Modulation of human lymphocytes responses by low density lipoproteins (LDL) : enhancement but not immunosuppression is mediated by LDL receptors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81 : 4539-4543.

CUTHBERT J. A., RUSSEL D. W., LIPSKY P. E.

Regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in human lymphocytes.

J. Biol. Chem., 1989, 264 : 1298-1304.

DANIEL T. O., SCHNEIDER W. J., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S.

Visualization of lipoprotein receptors by ligand blotting.

J. Biol. Chem., 1983, 258 : 4606-4611.

DASHTI N., WILLIAMS D. L., ALAUPOVIC P.

Effects of oleate and insulin on the production rates and cellular mRNA concentrations of apolipoproteins in HepG2 cells.

J. Lipid Res., 1989, 30 : 1365-1373.

DAVIS C. G., GOLDSTEIN J. L., SÜDHOF T. C., ANDERSON R. G. W., RUSSEL D. W., BROWN M. S.

Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region.

Nature, 1987a, 326 : 760-765.

DAVIS C. G., VAN DRIEL I. R., RUSSEL D. W., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

The low density lipoprotein receptor.

Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis.

J. Biol. Chem., 1987b, 262 : 4075-4082.

DAVIS P. J., POZNANSKY M. J.

Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by changes in microsomal cholesterol content or phospholipid composition.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84 : 118-121.

DAVIS R. A., PREWETT A. B., CHAN D. C. F., THOMPSON J. J., BORCHARDT R. A., GALLAHER W. R.

Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins : immunologic characterization of apolipoprotein B in lipoproteins and hepatic membrane fractions and its intracellular distribution.

J. Lipid Res., 1989, 30 : 1185-1196.

DAWSON P. A., HOFMANN S. L., VAN DER WESTHUYZEN D. R., SÜDHOF T. C., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1.

J. Biol. Chem., 1988, 263 : 3372-3379.

DEEFLEY R. G., TAM S. P., ARCHER T. K.

The effects of estrogen on apolipoprotein synthesis.

Can. J. Biochem. Cell. Biol., 1985, 63 : 882-889.

DELATTRE S.

Quantification des LDL récepteurs des lymphocytes par immunofluorescence indirecte : application à l'étude de sujets atteints d'hypercholestérolémie familiale.

Diplôme d'Etudes Approfondies - Universités de Lille I et de Lille II - Juin 1988.

DUNNING A. M., DURIEZ P., VU DAC N., FRUCHART J.-C., HUMPHRIES S.

Association between epitopes detected by monoclonal antibody BIP-45 and the XbaI polymorphism of apolipoprotein B.

Clinical Genetics, 1988a, 33 : 181-188.

DUNNING A. M., TIKKANEN M. J., EHNHOLM C., BÜLTER R., HUMPHRIES S. E.

Relationships between DNA and protein polymorphisms of apolipoprotein B.

Hum. Genet., 1988b, 78 : 325-329.

DURIEZ P., BÜTLER R., TIKKANEN M. J., STEINMETZ J., VU DAC N., BÜTLER-BRUNNER E., LUYEYE I., BARD J.-M., PUCHOIS P., FRUCHART J.-C.

A monoclonal antibody (BIP45) detects Ag (c.g) polymorphism of human apolipoprotein B.

Journal of Immunological Methods, 1987a, 102 : 205-212.

DURIEZ P., VU DAC N., KOFFIGAN M., PUCHOIS P., DEMARQUILLY C., FIEVET C., LUYEYE I., BARD J.-M., FOURRIER J. L., SLIMANE N., LABLANCHE J. M., BERTRAND M., FRUCHART J.-C.

Detection of human apolipoprotein B polymorphic species with one monoclonal antibody (BIP 45) against low density lipoprotein.

Influence of this polymorphism on lipid levels and coronary artery stenosis. Atherosclerosis, 1987b, 66 : 153-161.

ECKARDT H., FILIPOVIC I., HASILIK A., BUDDECKE E.

Calmodulin antagonists increase the amount of mRNA for the low density lipoprotein receptor in skin fibroblasts.

Biochem. J., 1988, 252 : 889-892.

ESFAHANI M., SCERBO L., DEVLIN T. M.

A requirement of cholesterol and its structural features for a human macrophage-like cell line.

J. Cell. Biochem., 1984, 25 : 87-97.

ESSER V., LIMBIRD L. E., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L., RUSSEL D. W.

Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor.

J. Biol. Chem., 1988, 263 : 13282-13290.

FIEVET C., DURIEUX C., MILNE R. W., DELAUNAY T., AGNANI G., BAZIN H., MARCEL Y. L., FRUCHART J.-C.

Rat monoclonal antibodies to human apolipoprotein B : advantages and applications.

J. Lipid Res., 1989, 30 : 1015-1024.

FIEVET C., KOFFIGAN M., OVRY D., MARCOVINA S., MOSCHETTO Y., FRUCHART J.-C.

Non competitive enzyme linked immunoassay for apolipoprotein B in serum. Clin. Chem., 1984, 30 : 98-100.

FIEVET C., MEJEAN L., DROUIN P., FRUCHART J.-C.

Molecular analysis of atherogenic lipoprotein particles in adequately controlled type I diabetes mellitus.

Eicosanoids, apolipoproteins, lipoprotein particles, and atherosclerosis. Malmendier C. L. et Alaupovic P., 1988.

FILIPOVIC I., BUDDECKE E.

Calmodulin antagonists stimulate LDL receptor synthesis in human skin fibroblasts.

Biochim. Biophys. Acta, 1986, 876 : 124-132.

FLOREN C. H., KUSHWANA R. S., HAZZARD W. R., ALBERS J. J.

Estrogen induced increased in uptake of cholesterol rich very low density lipoproteins in perfused rabbit liver.

Metabolism, 1981, 30 : 367-375.

FREEMAN M. L., PRIGGE W. F., HUNNINGHAKE D. B., DUANE W. C., GEBHARD R. L.

Intestinal HMG CoA reductase activity is low in hypercholesterolemic patients and is further decreased with lovastatin therapy.

J. Lipid Res., 1988, 29 : 839-845.

FROSTEGARD J., HAMSTEN A., GIDLUND M., NILSSON J.

Low density lipoprotein-induced growth of U937 cells : a novel method to determine the receptor binding of low density lipoprotein.

J. Lipid Res., 1990a, 31 : 37-44.

FROSTEGARD J., NILSSON J., HAEGERSTRAND A., HAMSTEN A., WIGZELL H., GIDLUND M.

Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990b, 87 : 904-908.

FRUCHART J.-C., KANDOUSSI A., PARSY D., KOREN E., PUCHOIS P.

Measurement of lipoprotein particles defined by their apolipoprotein composition using immunosorbent assay.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1985, 23 : 619-622.

FUNAHASHI T., MIYAKE Y., YAMAMOTO A., MATSUZAWA Y., KISHINO B.

Mutations of the low density lipoprotein receptor in Japanese kindreds with familial hypercholesterolemia.

Hum. Genet., 1988, 79 : 103-108.

GENEST J. J., ORDOVAS J. M., McNAMARA J. R., ROBBINS A. M., MEADE T., COHN S. D., SALEM D. N., WILSON P. W. F., MASHARANI U., FROSSARD P., SCHAEFER E. J.

DNA polymorphisms of apolipoprotein B gene in patients with premature coronary artery disease.

Atherosclerosis, 1990, 82 : 7-17.

GIANTURCO S. H., BRADLEY W. A.

Interactions of triglyceride-rich lipoproteins with receptors : modulation by thrombin.

Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 1986, 12 : 277-279.

GIBBONS G. F.

Assembly and secretion of hepatic very low density lipoprotein.

Biochem. J., 1990, 268 : 1-13.

GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S.

Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts : comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia.

J. Biol. Chem., 1974, 249 : 5153-5162.

GOLDSTEIN J. L., DANA S. E., BRUNSCHEDE G. Y., BROWN M. S.

Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia : evidence for different mutations affecting functions of low density lipoprotein receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72 : 1092-1096.

GOLOS T. G., STRAUSS J. F.

Regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in cultured human granulosa cells : roles of human chorionic gonadotropin, 8-bromo-3'-5'-cyclic adenosine monophosphate, and protein synthesis.

Molecular Endocrinology, 1987, 1 : 321-326.

GORDON T., KANNEL W. B., HJORTLAND M. C., McNAMARA P. M.

Menopause and coronary heart disease : the Framingham study.

Ann. Intern. Med., 1978, 89 : 157-162.

GROSS G., SYKES M., ARELLANO R., FONG B., ANGEL A.

HDL clearance and receptor-mediated catabolism of LDL are reduced in hypothyroid rats.

Atherosclerosis, 1987, 66 : 269-275.

GRUNDY S. M., CHAIT A., BRUNZELL J. D.

Familial combined hyperlipidemia ; Workshop.

Arteriosclerosis, 1987, 7 : 203-207.

GRUNDY S. M., VEGA G. L.

Influence of mevinolin on metabolism of low density lipoproteins in primary moderate hypercholesterolemia.

J. Lipid Res., 1985, 26 : 1464-1475.

GYLLING H., MIETTINEN T. A.

A longitudinal study of cholesterol metabolism in familial hypercholesterolemia.

Atherosclerosis, 1988, 73 : 63-66.

HÄMÄLÄINEN T., PALOTIE A., AALTO-SETÄLÄ K., KONTULA K., TIKKANEN M. J.

Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Finnish patients with elevated serum cholesterol.

Atherosclerosis, 1990, 82 : 177-183.

HAVEKES L., UTERMANN G., DE KNIJFF P., KLASSEN E.

Characterization and mode of inheritance of apolipoprotein E3.

Adv. Exp. Med. Biol., 1987, 210 : 41-45.

HAVEL R. J.

Familial dysbetalipoproteinemia.

New aspects of pathogenesis and diagnosis.

Med. Clin. North. Am., 1982, 66 : 441-454.

HAVEL R. J.

Lowering cholesterol.

Rationale, mechanisms and means.

J. Clin. Invest., 1988, 81 : 1653-1660.

HAVEL R. J., EDER H. A., BRAGDON J. H.

The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.

J. Clin. Invest., 1955, 34 : 1345-1353.

HEBER D., KOZIOL B. J., HENSON L. C.

Low density lipoprotein receptor regulation and the cellular basis of atherosclerosis : implications for nutritional and pharmacologic treatment of hypercholesterolemia.

Am. J. Cardiol., 1987, 60 : 4G-8G.

HELVE E., TIKKANEN M. J.

Comparison of lovastatin and probucol in treatment of familial and non-familial hypercholesterolemia : different effects on lipoprotein profiles.

Atherosclerosis, 1988, 72 : 189-197.

HIRAMATSU K., BIERMAN E. L., CHAIT A.

Metabolism of low density lipoprotein from patients with diabetic hypertriglyceridemia by cultured human skin fibroblasts.

Diabetes, 1985, 34 : 8-14.

HO Y. K., BROWN M. S., BILHEIMER D. W., GOLDSTEIN J. L.

Regulation of LDL receptor in freshly isolated human lymphocytes.

J. Clin. Invest., 1976a, 58 : 1465-1474.

HO Y. K., BROWN M. S., KAYDEN H. J., GOLDSTEIN J. L.

Binding, internalization, and hydrolysis of low density lipoprotein in long-term lymphoid cell lines from a normal subject and a patient with homozygous familial hypercholesterolemia.

J. Exp. Med., 1976b, 144 : 444-455.

HOBBS H. H., BROWN M. S., RUSSEL D. W., DAVIGNON J., GOLDSTEIN J. L.

Deletion in the gene for the LDL receptor in majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia.

N. Eng. J. Med., 1987, 317 : 734-737.

HOBBS H. H., LEITERSDORF E., LEFFERT C. C., CRYER D. R., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

Evidence for a dominant gene that suppresses hypercholesterolemia in a family with defective low density lipoprotein receptors.

J. Clin. Invest., 1989, 84 : 656-664.

HOULSTON R. S., TURNER P. R., REVILL J., LEWIS B., HUMPHRIES S. E.

The fractional catabolic rate of low density lipoprotein in normal individuals is influenced by variation in the apolipoprotein B gene : a preliminary study.

Atherosclerosis, 1988, 71 : 81-85.

HOWARD B. V.

Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus.

J. Lipid Res., 1987, 28 : 613-628.

HUANG L.-S., BRESLOW J. L.

A unique AT-rich hypervariable minisatellite 3' to the apoB gene defines a high information restriction fragment length polymorphism.

J. Biol. Chem., 1987, 262 : 8952-8955.

HUANG L.-S., RIPPS M. E., BRESLOW J. L.

Molecular basis of five apolipoprotein B gene polymorphisms in noncoding regions.

J. Lipid Res., 1990, 31 : 71-77.

HUANG L.-S., RIPPS M. E., KORMAN S. H., DECKELBAUM R. J., BRESLOW J. L.
Hypobetalipoproteinemia due to an apolipoprotein B gene exon 21 deletion
derived by Alu-Alu recombination.

J. Biol. Chem., 1989, 264 : 11394-11400.

HUMMEL M., LI Z., PFAFFINGER D., NEVEN L., SCANU A. M.

Familial hypercholesterolemia in a rhesus monkey pedigree : molecular
basis of low density lipoprotein receptor deficiency.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1990, 87 : 3122-3126.

INNERARITY T. L., MAHLEY R. W., WEISGRABER K. H., BERSOT T. P., KRAUSS R.
M., VEGA G. L., GRUNDY S. M., FRIEDL W., DAVIGNON J., McCARTHY B. J.

Familial defective apolipoprotein B-100 : a mutation of apolipoprotein B that
causes hypercholesterolemia.

J. Lipid Res., 1990, 31 : 1337-1349.

INNERARITY T. L., WEISGRABER K. H., ARNOLD K. S., MAHLEY R. W., KRAUSS R.
M., VEGA G. L., GRUNDY S. M.

Familial defective apolipoprotein B-100 : low density lipoproteins with
abnormal receptor binding.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84 : 6919-6923.

INNERARITY T. L., WEISGRABER K. H., ARNOLD K. S., RALL S. C., MAHLEY R. W.

Normalization of receptor binding of apolipoprotein E2 : evidence for
modulation of the binding site conformation.

J. Biol. Chem., 1984, 259 : 7261-7267.

ISHIBASHI S., INABA T., SHIMANO H., HARADA K., INOUE I., MOKUNO H., MORI
N., GOTODA T., TAKAKU F., YAMADA N.

Monocytes colony-stimulating factor enhances uptake and degradation of
acetylated low density lipoproteins and cholesterol esterification in human
monocyte-derived macrophages.

J. Biol. Chem., 1990, 265 : 14109-14117.

ISSEMANN I., GREEN S.

Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by
peroxisome proliferators.

Nature, 1990, 347 : 645-649.

JENNER K., SIDOLI A., BALL M., RODRIGUEZ J. R., PAGANI F., GIUDICI G.,
VERGANI C., MANN J., BARALLE F. E., SHOULDERS C. C.

Characterization of genetic markers in the 3' end of the apoB gene and their
use in family and population studies.

Atherosclerosis, 1988, 69 : 39-49.

JOHNSTON D., ROBSON J. M., MELNYKOVICH G.

Reduction in cell-associated low density lipoprotein in dexamethasone-
treated HeLa cells : suggested mechanism.

Endocrinology, 1983, 113 : 907-914.

KADONAGA J. T., JONES K. A., TJIAN R.

Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1.

TIBS, 1986, 11 : 20-23.

KANE J. P., HAVEL R. J.

Treatment of hypercholesterolemia.

Annu. Rev. Med., 1986, 37 : 427-435.

KANNEL N. B., HJORTLAND M. C., McNAMARA P. M., GORDON T.

Menopause and risk of cardiovascular disease : the Framingham study.

Ann. Intern. Med., 1976, 85 : 447-452.

KANNEL W. B., CASTELLI W. P., GORDON T., McNAMARA P. M.

Serum cholesterol, lipoproteins and the risk of coronary heart disease : the
Framingham study.

Ann. Intern. Med., 1971, 74 : 1-12.

KARDASSIS D., HADZOPOULOU-CLADARAS M., RAMJI D. P., CORTESE R., ZANNIS
V. I., CLADARAS C.

Characterization of the promoter elements required for hepatic and
intestine transcription of the human apoB gene : definition of the DNA-
binding site of a tissue specific transcriptional factor.

Molecular and Cellular Biology, 1990, 10 : 2653-2659.

KATZ S. S., SMALL D. M.

Isolation and partial characterization of the lipid phase of human atherosclerosis plaques.

J. Biol. Chem., 1983, 255 : 9753-9759.

KEIDAR S., GOLDBERG A. C., COOK K., BATEMAN J., SCHONFELD G.

High carbohydrate fat-free diet modulates epitope expression of LDL-apoB100 and interaction of LDL with human fibroblasts.

J. Lipid Res., 1989, 30 : 1331-1339.

KENNELLY P. J., RODWELL V. W.

Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase by reversible phosphorylation-dephosphorylation.

J. Lipid Res., 1985, 26 : 903-914.

KITA T., BROWN M. S., BILHEIMER D. W., GOLDSTEIN J. L.

Delayed clearance of very low density and intermediate density lipoproteins with enhanced conversion to low density lipoprotein in WHHL rabbits.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79 : 5693-5697.

KLEINMAN Y., KRUL E., BURNES M., ARONSON W., PFLEGER B., SCHONFELD G.

Lipolysis of LDL with phospholipase A2 alters the expression of selected apoB-100 epitopes and the interaction of LDL with cells.

J. Lipid Res., 1988, 29 : 729-743.

KNIGHT B. L., GAVIGAN S. J. P., SOUTAR A. K., PATEL D. D.

Defective processing and binding of low density lipoprotein receptors in fibroblasts from a familial hypercholesterolaemic subject.

Eur. J. Biochem., 1989, 179 : 693-698.

KNIGHT B. L., PATEL D. D., SOUTAR A. K.

Regulation of synthesis and cell content of the low density lipoprotein receptor protein in cultured fibroblasts from normal and familial hypercholesterolaemic subjects.

Eur. J. Biochem., 1987, 163 : 189-196.

KNOTT T. J., PEASE R. J., POWEL L. M., WALLIS S. C., RALL S. C., INNERARITY T. L., BLACKHART B., TAYLOR W. H., MARCEL Y., MILNE R., JOHNSON D., FULLER M., LUSIS A. J., McCARTHY B. J., MAHLEY R. W., LEVY-WILSON B., SCOTT J.

Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B.

Nature, 1986, 323 : 734-738.

KNOTT T. J., RALL S. C., INNERARITY T. L., JACOBSON S. F., URDEA M. S., LEVY-WILSON B., POWELL L. M., PEASE R. J., EDDY R., NAKAI H., BYERS M., PRIESTLEY L. M., ROBERTSON E., RALL L. B., BETSHOLTZ C., SHOWS T. B., MAHLEY R. W., SCOTT J.

Human apolipoprotein B : structure of carboxy-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization.

Science, 1985, 230 : 37-43.

KNUIMAN J. T., WEST C. E., KATAN M. B., HAUTVAST J. G. A. J.

Total cholesterol and high density lipoprotein cholesterol levels in populations differing in fat and carbohydrate intake.

Arteriosclerosis, 1987, 7 : 612-619.

KODAMA T., FREEMAN M., ROHRER L., ZABRECKY J., MATSUDAIRA P., KRIEGER M.

Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils.

Nature, 1990, 343 : 531-535.

KOSYKH V. A., SURGUCHIV A. P., PODRES E. A., NOVIKOV D. K., SUDARICKOV A. B., BERESTETSKAYA YU V., REPIN V. S., SMIRNOV V. N.

VLDL apolipoprotein secretion and apoB mRNA levels in primary culture of cholesterol-loaded rabbit hepatocytes.

FEBS Lett., 1988, 232 : 103-106.

KOVANEN P. T., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

Increased binding of low density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17 alpha-ethinyl estradiol.

J. Biol. Chem., 1979, 254 : 1367-1373.

KOWAL R. C., HERZ J., GOLDSTEIN J. L., ESSER V., BROWN M. S.

Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86 : 5810-5814.

KRICHEVSKY D., TEPPER S. A., STORY J. A.

Influence of procetofen on lipid metabolism in normocholesterolemic rats.

Pharmacol. Res. Comm., 1979, 11 : 635-641.

KRUL E. S., KINOSHITA M., TALMUD P., HUMPHRIES S., TURNER S., GOLDBERG A. C., COOK K., BOERWINKLE E., SCHONFELD G.

Two distinct truncated apolipoprotein B species in a kindred with hypobetalipoproteinemia.

Arteriosclerosis, 1989, 9 : 856-868.

KUUSI T., TASKINEN M.-R., NIKKILÄ E. A.

Lipoproteins, lipolytic enzymes, and hormonal status in hypothyroid women at different levels of substitution.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1988a, 66 : 51-56.

KUUSI T., TASKINEN M.-R., SOLAKIVI T., KAUPPINEN-MÄKELIN R.

Role of apolipoprotein E and C in type V hyperlipoproteinemia.

J. Lipid Res., 1988b, 29 : 293-298.

LAW A., SCOTT J.

A cross-species comparison of the apolipoprotein B domain that binds to the LDL receptor.

J. Lipid Res., 1990, 31 : 1109-1120.

LEHRMAN M. A., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S., RUSSEL D. W., SCHNEIDER W. J.

Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain.

Cell, 1985a, 41 : 735-743.

LEHRMAN M. A., SCHNEIDER W. J., SÜDHOF T. C., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.,
RUSSEL D. W.

Mutation in LDL receptor : Alu-Alu recombination deletes exons encoding
transmembrane and cytoplasmic domains.

Science, 1985b, 227 : 140-146.

LEITERSDORF E., BANAI Y., FRIEDMAN G., KAEMPFER R.

Superinduction of the human gene encoding low density lipoprotein
receptor.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989a, 165 : 574-580.

LEITERSDORF E., HOBBS H. H., FOURIE A. M., JACOBS M., VAN DER WESTHUYZEN
D. R., COETZEE G. A.

Deletion in the first cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor
impairs its transport but not lipoprotein binding in fibroblasts from a
subject with familial hypercholesterolemia.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85 : 7912-7916.

LEITERSDORF E., TOBIN E. J., DAVIGNON J., HOBBS H. H.

Common low density lipoprotein receptor mutations in the french canadian
population.

J. Clin. Invest., 1990, 85 : 1014-1023.

LEITERSDORF E., VAN DER WESTHUYZEN D. R., COETZEE G. A., HOBBS H. H.

Two common low density lipoprotein receptor gene mutations cause familial
hypercholesterolemia in Afrikaners.

J. Clin. Invest., 1989b, 84 : 954-961.

LEREN T. P., BLOMHOFF R., BERG K.

Low density lipoprotein receptor determination in peripheral blood
mononuclear cells : influence of differences in cell concentration.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1986, 46 : 477-488.

LEREN T. P., HJERMANN I., BERG K., LEREN P., FOSS O. P., VIKSMOEN L.

Effects of lovastatin alone and in combination with cholestyramine on serum
lipids and apolipoproteins in heterozygotes for familial
hypercholesterolemia.

Atherosclerosis, 1988, 73 : 135-141.

LINDGREN V., LUSKEY K. L., RUSSEL D. W., FRANCKE U.

Human genes involved in cholesterol metabolism : chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase with cDNA probes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82 : 8567-8571.

LISCUM L., FINER-MOORE J., STROUD R. M., LUSKEY K., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum.

J. Biol. Chem., 1985, 260 : 522-530.

LOMBARDI P., DE WIT E., FRANTS R. R., HAVEKES L. M.

Characterization of the LDL receptor in Epstein-Barr virus transformed lymphocytes.

Biochim. Biophys. Acta, 1990, 1044 : 127-132.

LOWE S. W., CHECOVICH W. J., RAPACZ J., ATTIE A. D.

Defective receptor binding of low density lipoprotein from pigs possessing mutant apolipoprotein B alleles.

J. Biol. Chem., 1988, 263 : 15467-15473.

MA P. T. S., GIL G., SÜDHOF T. C., BILHEIMER D. W., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S.

Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986a, 83 : 8370-8374.

MA P. T. S., YAMAMOTO T., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S.

Increased mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of rabbits treated with 17 alpha-ethinyl estradiol.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986b, 83 : 792-796.

MA Y., SCHUMAKER V. N., BUTLER R., SPARKES R.

Two DNA restriction fragment length polymorphisms associated with Ag (t/z) and Ag (g/c) antigenic sites of human apolipoprotein B.

Arteriosclerosis, 1987, 7 : 301-305.

MA Y., WANG X., BUTLER R., SHUMAKER V. N.

BSP 12861 restriction fragment length polymorphism detects Ag (c,g) locus of human apolipoprotein B in all 117 persons studied.

Arteriosclerosis, 1989, 9 : 242-246.

MACFARLANE A. S.

Efficient trace-labelling of proteins with iodine.

Nature, 1958, 182 : 53-62

MAHLEY R. W., INNERARITY J. L., WEISGRABER K. H.

Alterations in metabolic activity of plasma lipoproteins following selective chemical modification of the apoproteins.

Ann. N. Y. Acad. Sci. USA, 1980, 348 : 265-277.

MALMENDIER C. L., LONTIE J. F., DELCROIX C., DUBOIS D. Y., MAGOT T., DE ROY L.

Apolipoproteins C-II and C-III metabolism in hypertriglyceridemic patients. Effect of a drastic triglycerides reduction by combined diet restriction and fenofibrate administration.

Atherosclerosis, 1989, 77 : 139-149.

MAZIERE C., MAZIERE J.-C., SALMON S., AUCLAIR M., MORA L., MOREAU M., POLONOVSKI J.

Cyclic AMP decreases LDL catabolism and cholesterol synthesis in the human hepatoma cell line HepG2.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, 1 : 424-431.

MAZZONE T., BASHEERUDDIN K., PING L., FRAZER S., GETZ G. S.

Mechanism of the growth-related activation of the low density lipoprotein receptor pathway.

J. Biol. Chem., 1989, 264 : 1787-1792.

MAZZONE T., BASHEERUDDIN K., PING L., SCHICK C.

Relation of growth- and sterol-related regulatory pathways for low density lipoprotein receptor gene expression.

J. Biol. Chem., 1990, 265 : 5145-5149.

McNAMARA D. J., KOLB R., PARKER T. S., BATWIN H., SAMUEL P., BROWN C. D.,
AHRENS E. H.

Heterogeneity of cholesterol homeostasis in man.

Response to changes in dietary fat quality and cholesterol quantity.

J. Clin. Invest., 1987, 79 : 1729-1739.

MENSINK R. P., KATAN M. B.

Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids
on levels of low density and high density lipoprotein cholesterol in healthy
women and men.

N. Engl. J. Med., 1989, 321 : 436-441.

MIAO E., WILSON S. R., JAVITT N. B.

Effect of 26-thiacholesterol and 26-aminocholesterol, analogues of 26-
hydroxycholesterol, on cholesterol synthesis and low density lipoprotein
receptor binding.

Biochem. J., 1988, 255 : 1049-1052.

MIDDLETON A., MIDDLETON B.

Agents which increase cyclic AMP have diverse effects on low density
lipoprotein receptor function in human vascular smooth muscle cells and
skin fibroblasts.

Biochem. J., 1990, 267 : 607-614.

MIETTINEN T. A., GYLLING H., VANHANNEN H.

Serum cholesterol response to dietary cholesterol and apoprotein E
phenotype.

The Lancet, 1988, November 26, 1261.

MIETTINEN T. A., KESANIEMI Y. A.

Cholesterol absorption : regulation of cholesterol synthesis and elimination,
and within-population variations of serum cholesterol levels.

Am. J. Clin. Nutr., 1989, 49 : 629-635.

MILLER N. E.

Why does plasma low density lipoprotein concentration in adults increase
with age ?

The Lancet, 1984, February 4, 263-267.

MILNE R. W., BLANCHETTE L., THEOLIS R., WEECH P. K., MARCEL Y. L.

Monoclonal antibodies distinguish between lipid-dependent and reversible conformational states of human apolipoprotein B.

Mol. Immunol., 1987, 24 : 435-447.

MILNE R. W., THEOLIS R., MAURICE R., PEASE R. J., WEECH P. K., RASSART E., FRUCHART J.-C., SCOTT J., MARCEL Y. L.

The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B.

J. Biol. Chem., 1989, 264 : 19754-19760.

MIYAKE Y., TAJIMA S., FUNAHASHI T., YAMAMOTO A.

Analysis of a recycling-impaired mutant of low density lipoprotein receptor in familial hypercholesterolemia.

J. Biol. Chem., 1989, 264 : 16584-16590.

MOLOWA D. T., CIMIS G. M.

Co-ordinate regulation of low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and synthase gene expression in HepG2 cells.

Biochem. J., 1989, 260 : 731-737.

NEITZEL H.

A routine method for the establishment of permanent lymphoblastoid cell lines.

Hum. Genet., 1986, 73 : 320-326.

ORAM J. F., ALBERS J. J., CHEUNG M. C., BIERMAN E. L.

The effects of subfractions of high density lipoprotein on cholesterol efflux from cultured fibroblasts.

J. Biol. Chem., 1981, 258 : 8348-8356.

OSBORNE T. F., GIL G., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S.

Operator constitutive mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase abolishes protein binding to sterol regulatory element.

J. Biol. Chem., 1988, 263 : 3380-3387.

PACKARD C. J., SHEPHERD J.

The hepatobiliary axis and lipoprotein metabolism : effects of bile acid sequestrants and ileal bypass surgery.

J. Lipid Res., 1982, 7 : 1081-1090.

PANINI S. R., SCHNITZER-POLOKOFF R., SPENCER T. A., SINENSKY M.

Sterol-independent regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by mevalonate in Chinese hamster ovary cells.

J. Biol. Chem., 1989, 264 : 11044-11052.

PEASE R. J., MILNE R. W., JESSUP W. K., LAW A., PROVOST P., FRUCHART J.-C., DEAN R. G., MARCEL Y. L., SCOTT J.

Use of bacterial expression cloning to localize the epitopes for a series of monoclonal antibodies against apolipoprotein B-100.

J. Biol. Chem., 1990, 265 : 553-568.

PETERSEN G. L.

A simplification of the protein assay method of Lowry which is more generally applicable.

Anal. Biochem., 1977, 83 : 346-356.

PITAS R. E.

Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells.

Up-regulation by phorbol esters.

J. Biol. Chem., 1990, 265 : 12722-12727.

PITAS R. E., INNERARITY T. L., ARNOLD K. S., MAHLEY R. W.

Rate and equilibrium constants for binding of apoE HDLc (a cholesterol-induced lipoprotein) and low density lipoproteins to human fibroblasts : evidence for multiple receptor binding of apoE HDLc.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76 : 2311-2315.

PITAS R. E., INNERARITY T. L., WEINSTEIN J. N., MAHLEY R. W.

Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy.

Arteriosclerosis, 1981, 1 : 177-185.

PRIESTLEY L., KNOTT T., WALLIS S., POWELL L., PEARSE R., SIMON A., SCOTT J.
RFLP for the human apolipoprotein B gene.
Nucleic Acids Res., 1985, 13 : 6789-6794.

PULLINGER C. R., NORTH J. D., TENG B.-B., RIFICI V. A., DE BRITO A. E. R., SCOTT J.

The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2 cells : regulation of secretion by oleic acid, albumin, and insulin, and measurement of the mRNA half-life.

J. Lipid Res., 1989, 30 : 1065-1077.

RAJAVASHISTH T. B., TAYLOR A. K., ANDALIBI A., SVENSON K. L., LUSIS A. J.

Identification of a zinc finger protein that binds to the sterol regulatory element.

Science, 1990, 245 : 640-643.

RAVEH D., ISRAELI A., ARNON R., EISENBERG S.

Effects of lovastatin therapy on LDL receptor activity in circulating monocytes and on structure and composition of plasma lipoproteins.

Atherosclerosis, 1990, 82 : 19-26.

REDGRAVE T. G., SNIBSON D. A.

Clearance of chylomicron triacylglycerol and cholesteryl ester from the plasma of streptozotocin-induced diabetic and hypercholesterolemic hypothyroid rats.

Metabolism, 1977, 26 : 493-503.

ROHRER L., FREEMAN M., KODOMA T., PENMAN M., KRIEGER M.

Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II.

Nature, 1990, 343 : 570-572.

RUDLING M. J., REIHNER E., EINARSSON K., EWERTH S., ANGELIN B.

Low density lipoprotein receptor binding activity in human tissues : quantitative importance of hepatic receptors and evidence for regulation of their expression in vivo.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87 : 3469-3473.

RUDNEY H., SEXTON R. C.

Regulation of cholesterol biosynthesis.

Ann. Rev. Nutr., 1986, 6 : 245-272.

RUSSEL D. W., SCHNEIDER W. J., YAMAMOTO T., LUSKEY K. L., BROWN M. S.,
GOLDSTEIN J. L.

Domain map of the LDL receptor : sequence homology with the epidermal
growth factor precursor.

Cell, 1984, 37 : 577-585.

RUSSEL D. W., YAMAMOTO T., SCHNEIDER W. J., SLAUGHTER C. J., BROWN M. S.,
GOLDSTEIN J. L.

cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor : feedback
regulation of a receptor mRNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80 : 7501-7505.

SALTER A. M., FISHER S. C., BRINDLEY D. N.

Binding of low density lipoprotein to monolayer cultures of rat hepatocytes
is increased by insulin and decreased by dexamethasone.

FEBS Lett., 1987, 220 : 159-162.

SALTER A. M., FISHER S. C., BRINDLEY D. N.

Interaction of triiodothyronine, insulin and dexamethasone on the binding
of human LDL to rat hepatocytes in monolayer culture.

Atherosclerosis, 1988, 71 : 77-80.

SATO R., IMANAKA T., TAKATSUKI A., TAKANO T.

Degradation of newly synthesized apolipoprotein B-100 in a pre-Golgi
compartment.

J. Biol. Chem., 1990, 265 : 11880-11884.

SAUCIER S. E., KANDUTSCH A. A., GAYEN A. K., SWAHN D. K., SPENCER T. A.

Oxysterol regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in liver.

J. Biol. Chem., 1989, 264 : 6863-6869.

SCARABOTTOLO L., TREZZI E., ROMA P., CATAPANO A. L.

Experimental hypothyroidism modulates the expression of the low density lipoprotein receptor by the liver.

Atherosclerosis, 1986, 59 : 329-333.

SCHNEIDER W. J., BEISIEGEL U., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S.

Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164 000 molecular weight.

J. Biol. Chem., 1982, 257 : 2664-2673.

SCHUSTER H., RAUH G., KORMANN B., HEPP T., HUMPHRIES S., KELLER C., WOLFRAM G., ZÖLLNER N.

Familial defective apolipoprotein B-100.

Comparison with familial hypercholesterolemia in 18 cases detected in Munich.

Arteriosclerosis, 1990, 10 : 577-581.

SCOTT J.

Unravelling atherosclerosis.

Nature, 1989, 338 : 118-119.

SCOTT J.

Regulation of the biosynthesis of apolipoprotein B-100 and apolipoprotein B-48.

Current Opinion in Lipidology, 1990, 1 : 96-103.

SHEPHERD J., PACKARD C. J., BICKER S., LAWRIE T. D. V., MORGAN H. G.

Cholestyramine promotes receptor-mediated low density lipoprotein catabolism.

N. Engl. J. Med., 1980, 302 : 1219-1222.

SIMONS L. A., SIMONS J., JONES A. S.

The interactions of body weight, age, cigarette smoking and hormone usage with blood pressure and plasma lipids in an australian community.

Aust. NZ J. Med., 1984, 14 : 215-221.

SMIT M., DE KNIJFF P., VAN DER KOOIJ-MEIJIS E., GROENENDIJK C., VAN DEN MAAGDENBERG A. M. J. M., GEVERS LEUVEN J. A., STALENHOF A. F. H., STUYT P. M. J., FRANTS R. R., HAVEKES L. M.

Genetic heterogeneity in familial dysbetalipoproteinemia.

The E2 (lys 146 -> gln) variant results in a dominant mode of inheritance.

J. Lipid Res., 1990, 31 : 45-53.

SMITH J. R., OSBORNE T. F., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S.

Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene.

J. Biol. Chem., 1990, 265 : 2306-2310.

SOHDI H. S., KUDCHODKAR B. J., MASON D. T.

Cholesterol metabolism in clinical hyperlipidemias.

Adv. Lipid. Res., 1980, 17 : 107-153.

SORIA L. F., LUDWIG E. H., CLARKE H. R. G., VEGA G. L., GRUNDY S. M., McCARTHY B. J.

Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86 : 587-591.

SORCI-THOMAS M., WILSON M. D., JOHNSON F. L., WILLIAMS D. L., RUDEL L. L.

Studies on the expression of genes encoding apolipoprotein B-100 and B-48 and the low density lipoprotein receptors in nonhuman primates.

Comparison of dietary fat and cholesterol.

J. Biol. Chem., 1989, 264 : 9039-9045.

SOUTAR A. K., KNIGHT B. L., PATEL D. D.

Identification of a point mutation in growth factor repeat C of the low density lipoprotein receptor gene in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia that affects ligand binding and intracellular movement of receptors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86 : 4166-4170.

SPADY D. K., DIETSCHY J. M.

Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster.

J. Clin. Invest., 1988, 81 : 300-309.

STEINBRECHER U. P., WITZTUM J. L.

Glucosylation of low density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism.

Diabetes, 1984, 33 : 130-134.

STEINMETZ A., BARBARAS R., GHALIM N., CLAVEY V., FRUCHART J.-C., AILHAUD G.

Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells.

J. Biol. Chem., 1990, 265 : 7859-7863.

STEWART J. M., PACKARD C. J., LORIMER A. R., BOAG D. E., SHEPHERD J.

Effects of bezafibrate on receptor mediated and receptor independent low density lipoprotein catabolism in type II hyperlipoproteinemic subjects.

Atherosclerosis, 1982, 44 : 355-363.

STRICKLAND D. K., ASHCOM J. D., WILLIAMS S., BURGESS W. H., MIGLIORINI M., ARGRAVES W. S.

Sequence identity between the alpha-2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor.

J. Biol. Chem., 1990, 265 : 17401-17404.

SÜDHOF T. C., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S., RUSSEL D. W.

The LDL receptor gene : a mosaic of exons shared with different proteins.

Science, 1985, 228 : 815-822.

SÜDHOF T. C., VAN DER WESTHUYZEN D. R., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S., RUSSEL D. W.

Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene.

J. Biol. Chem., 1987, 262 : 10773-10779.

SUZUKI K., SAKATA N., KITANI A., HARA M., HIROSE T., HIROSE W., NORIOKA K., HARIGAI M., KAWAGOE M., NAKAMURA H.

Characterization of human monocytic cell line, U937, in taking up acetylated low density lipoprotein and cholesteryl ester accumulation. A flow cytometric and HPLC study.

Biochim. Biophys. Acta, 1990, 1042 : 210-216.

TAKAGI K., ALVAREZ J. G., FAVATA M. F., TRZASKOS J. M., STRAUSS J. F.

Control of low density lipoprotein receptor gene promoter activity.

Ketoconazole inhibits serum lipoprotein but not oxysterol suppression of gene transcription.

J. Biol. Chem., 1989, 264 : 12352-12357.

TALMUD P. J., BARNI N., KESSLING A. M., CARLSSON P., DARNFORS C., BJURSELL G., GALTON D., WYNN V., KIRK H., HAYDEN M. R., HUMPHRIES S. E.

Apolipoprotein B gene variants are involved in the determination of serum cholesterol levels : a study in normo- and hyperlipidaemic individuals.

Atherosclerosis, 1987, 67 : 81-89.

TALMUD P., KING-UNDERWOOD L., KRUL E., SCHONFELD G., HUMPHRIES S. E.

The molecular basis of truncated forms of apolipoprotein B in a kindred with compound heterozygous hypobetalipoproteinemia.

J. Lipid Res., 1989, 30 : 1773-1779.

TANAKA R. D., LI A. C., FOGELMAN A. M., EDWARDS P. A.

Inhibition of lysosomal protein degradation inhibits the basal degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase.

J. Lipid Res., 1986, 27 : 261-273.

TIKKANEN M. J.

Immunogenetic polymorphism of apolipoprotein B in humans : studies with a monoclonal anti-Ag(c) antibody.

Am. Heart J., 1987, 113 : 428-432.

TIKKANEN M. J., EHNHOLM C., BÜTLER R., YOUNG S. G., CURTISS L. K., WITZTUM J. L.

Monoclonal antibody detects Ag polymorphism of apolipoprotein B.

FEBS Lett., 1986, 202 : 54.

TOLLESHAUG H., GOLDSTEIN J. L., SCHNEIDER W. J., BROWN M. S.

Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia.

Cell, 1982, 30 : 715-724.

TOLLESHAUG H., HOBGOOD K. K., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L.

The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia : multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor.

Cell, 1983, 32 : 941-951.

TRAIL K. N., JÜBGENS G., BÖCK G., HUBER L., SCHÖNITZER D., WIDHALM K., WINTER U., WICK G.

Analysis of fluorescent low density lipoprotein uptake by lymphocytes. Paradoxical increase in the elderly.

Mechanism of Ageing and Development, 1987, 40 : 261-288.

TUOMILEHTO J., SILVASTI M., MANNINE V., UU SITUPA M., ARO A.

Guargum and gemfibrozil - an effective combination in the treatment of hypercholesterolemia.

Atherosclerosis, 1989, 76 : 71-77.

TYBJAERG-HANSEN A., GALLAGHER J., VINCENT J., HOULSTON R., TALMUD P., DUNNING A. M., SEED M., HAMSTEN A., HUMPHRIES S. E., MYANT N. B.

Familial defective apolipoprotein B-100 : detection in the United Kingdom and Scandinavia, and clinical characteristics of ten cases.

Atherosclerosis, 1990, 80 : 235-242.

UNDERWOOD A. H., EMMETT J. C., ELLIS D., FLYNN S. B., LEESON P. D., BENSON G. M., NOVELLI R., PEARCE N. J., SHAH V. P.

A thyromimetic that decreases plasma cholesterol levels without increasing cardiac activity.

Nature, 1986, 324 : 425-433.

VAN DRIEL I. R., GOLDSTEIN J. L., SÜDHOF T. C., BROWN M. S.

First cystein-rich repeat ligand-binding domain of low density lipoprotein receptor binds Ca^{2+} and monoclonal antibodies, but not lipoproteins.

J. Biol. Chem., 1987, 262 : 17443-17449.

VIA D. P., PLANT A. L., CRAIG I. F., GOTTO A. M., SMITH L. C.

Metabolism of normal and modified low density lipoproteins by macrophages cell lines of murine and human origin.

Biochim. Biophys. Acta, 1985, 833 : 417-428.

VIA D. P., PONS L., DENNISON D. K., FANSLAW A. E., BERNINI F.

Induction of acetyl-LDL receptor activity by phorbol ester in human monocytes cell line THP-1.

J. Lipid Res., 1989, 30 : 1515-1524.

WADE D. P., KNIGHT B. L., SOUTAR A. K.

Regulation of low density lipoprotein receptor mRNA by insulin in human hepatoma HepG2 cells.

Eur. J. Biochem., 1989, 181 : 727-731.

WANG X., SCHLAPFER P., MA Y., BUTLER R., ELOVSON J., SHUMAKER V. N.

Apolipoprotein B : the Ag (a₁,d) immunogenetic polymorphism coincides with a T-to-C substitution at nucleotide 1981, creating an AluI restriction site. Arteriosclerosis, 1988, 8 : 529-535.

WEINTRAUB M. S., ZECHNER R., BROWN A., EISENBERG S., BRESLOW J. L.

Dietary polyunsaturated fats of the W-6 and W-3 series reduce postprandial lipoprotein levels.

J. Clin. Invest., 1988, 82 : 1884-1893.

WEISGRABER K. H., INNERARITY T., NEWHOUSE Y. M., YOUNG S. G., ARNOLD K. S., KRAUSS R. M., VEGA G. L., GRUNDY S. M., MAHLEY R. W.

Familial defective apolipoprotein B-100 ; enhanced binding of monoclonal antibody MB47 to abnormal low density lipoproteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85 : 9758-9762.

WINDLER E. T., KOVANEN P. T., CHAO Y. S., BROWN M. S., HAVEL R. J., GOLDSTEIN J. L.

The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver.

J. Biol. Chem., 1980, 255 : 10464-10471.

WONG S.-H., FISHER E. A., MARSH J. B.

Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on apolipoprotein B mRNA and secretion of very low density lipoprotein in HepG2 cells.

Arteriosclerosis, 1989, 9 : 836-841.

WOOLLET L. A., SPADY D. K., DIETSCHY J. M.

Mechanisms by which saturated triacylglycerols elevate the plasma low density lipoprotein cholesterol concentration in hamsters.

Differential effects of fatty acid chain length.

J. Clin. Invest., 1989, 84 : 119-128.

XU C., NANJEE N., TIKKANEN M. J., HUTTUNEN J. K., PIETINEN P., BUTLER R., ANGELICO F., DEL BON M., MAZZARELLA B., ANTONIO R., MILLER N. G., HUMPHRIES S. E., TALMIUD P. J.

Apolipoprotein B amino acid substitution from arginine to glutamine creates the Ag (h,i) epitope : the polymorphism is not associated with differences in serum cholesterol and apolipoprotein levels.

Hum. Gen., 1989, 82 : 322-326.

XU C. F., TIKKANEN M. J., HUTTUNEN J. K., PIETINEN P., BUTLER R., HUMPHRIES S. E., TALMUD P.

Apolipoprotein B signal peptide insertion/deletion polymorphism is associated with Ag epitopes and involved in the determination of serum triglyceride levels.

J. Lipid Res., 1990, 31 : 1255-1261.

YANG C.-Y., CHEN S.-H., GIANTURCO S. H., BRADLEY W. A., SPARROW J. T., TANIMURA M., LI W.-H., SPARROW D. A., DELOOF H., ROSSENEU M., LEE F.-S., GU Z.-W., GOTTO A. M., CHAN L.

Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100.

Nature, 1986, 323 : 738-742.

YANG C.-Y., GU Z. W., WENG S., KIM T. W., CHEN S.-H., POWNALL H. J., SHARP P.M., LIU S.-W., LI W.-H., GOTTO A. M., CHAN L.

Structure of apolipoprotein B-100 of human low density lipoproteins.

Arteriosclerosis, 1989, 9 : 96-107.

YAMADA N., SHIMANO H., MOKUNO H., ISHIBASHI S., GOTOHDA T., KAWAKANI M., WATANABE Y., AKANUMA Y., MURASE T., TAKAFU F.

Increased clearance of plasma cholesterol after injection of apolipoprotein E into Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86 : 665-669.

YAMAMOTO A., KAMIYA T., YAMAMURA T., YOKOYAMA S., HORIGUCHI H., FUNAHASHI T., KAWAGUCHI A., MIYAKE Y., BEPPU S., ISHIKAWA K., MATSUZAWA Y., TAKAICHI S.

Clinical features of familial hypercholesterolemia.

Arteriosclerosis, 1989, 9 : I-66 - I-74.

YAMAMOTO T., DAVIS C. G., BROWN M. S., SCHNEIDER W. J., CASEY M. L., GOLDSTEIN J. L., RUSSEL D. W.

The human LDL receptor : a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA.

Cell, 1984, 39 : 27-38.

YOUNG S. G., HUBL S. T.

An ApaI restriction site polymorphism is associated with the MB19 polymorphism in apolipoprotein B.

J. Lipid Res., 1989, 30 : 443-449.

YOUNG S. G., HUBL S. T., SMITH R. S., SNYDER S. M., TERDIMAN J. F.

Familial hypobetalipoproteinemia caused by a mutation in the apolipoprotein B gene that results in a truncated species of apolipoprotein B (B-31).

J. Clin. Invest., 1990, 85 : 933-942.

