



Académie Roumaine
Institut de Biologie Cellulaire et de Pathologie
„Nicolae Simionescu”



THÈSE

Modulation de l'expression des gènes des apolipoprotéines avec potentiel thérapeutique dans l'athérosclérose

Résumé

Directeur de thèse

Acad. Maya Simionescu

Doctorand

Trușcă Georgeta Violeta

BUCAREST
2013

SOMMAIRE

I ere Partie

Le niveau actuel des connaissances

Présentation	5
I. Métabolisme des lipoprotéines dans les conditions normales et pathologiques	7
I. 1. Classification et composition des lipoprotéines	7
I. 2. Caractéristiques générales des apolipoprotéines	14
I. 3. Métabolisme des chylomicrons, VLDL, LDL, IDL et HDL	19
I. 4. Implication des lipoprotéines dans la pathologie vasculaire, l'athérosclérose	22
I. 5. L'efflux de cholestérol à partir des cellules, un processus anti-athérosclérotique ...	26
II. Caractérisation structurale et fonctionnelle a apoE et apoCII	31
II. 1 Apolipoprotéine E	31
II. 1. 1. Structure du gène apoE	32
II. 1. 2. Régulation de gène apoE	32
II. 1. 3. Structure de la protéine apoE	35
II. 1. 4. Isoformes apoE	36
II. 1. 5. Récepteurs apoE	41
II. 1. 6. Rôle de l'apolipoprotéine E et son implication dans l'athérosclérose	44
II. 2. Apolipoprotéine CII	49
II. 2. 1. Structure du gène apoCII	49
II. 2. 2. Régulation de gène apoCII	50
II. 2. 3. Structure de la protéine apoCII	51
II. 2. 4. Fonctions principales de l'apoCII	54
III. Régulation de l'expression des gènes	56
III. 1. Éléments de régulation génique proximale et distale	56
III. 2. Le mécanisme d'initiation de la transcription du gène	58
III. 3. Les facteurs de transcription et des récepteurs nucléaires impliqués dans la modulation de l'expression d'un gène	60
III. 3. 1. Facteurs impliqués dans la différenciation des macrophages	61
III. 3. 2. Le complexe des facteurs de transcription AP-1	66
III. 3. 3. Les facteurs de transcription STAT	77
III. 3. 4. Les facteurs de transcription c-Myb	81
III. 3. 5. Récepteurs nucléaires RXR	83

II-eme Partie

Les contributions originales

IV. Matériel et méthodes	86
IV. 1. Cultures cellulaires	86
IV. 2. Les plasmides	87
IV. 2. 1. Les plasmides contenant des éléments de régulation de l'apoE	87
IV. 2. 2. Les plasmides contenant des éléments de régulation de l'apoCII	90
IV. 2. 3. Les plasmides contenant des éléments de régulation de l'apoCI et apoCIV	90
IV. 2. 4. Clonage de plasmides (+)ME.2-luc i (-)ME.2-luc	91
IV. 2. 5. Construction du plasmide donnant lieu à des shRNA pour l'inhibition de STAT1	94
IV. 2. 6. Le clonage de promoteur CMV dans pGL3 vecteur	97
IV. 2. 7. Clonage de pCMV-CHOP dans Sport6 vecteur	99
IV. 3. Transfection transitoire	101
IV. 4. Détermination de l'activité enzymatique de la luciférase et -galactosidase	102
IV. 5. Détermination de la concentration de protéines	103
IV. 6. Précipitations de protéines liées à l'ADN biotinylé	103
IV. 7. Immunotransfer	106
IV. 8. Technique 3C (chromosome capture conformationnel)	107
IV. 9. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	108
IV. 10. Technique de précipitation des protéines de fusion GST recombinantes	108
IV. 11. Co-immunoprécipitation	109
IV. 12. L'inhibition de l'expression du gène de STAT1	109
IV. 13. RT-PCR	110
IV. 14. Real Time PCR	111
IV. 15. Analyse statistique des résultats	113
V. Résultats et discussion	114
V. 1. Régulation de l'expression des gènes lors de la différenciation des monocytes en macrophages	114
V. 1. 1. Modulation de l'expression apoE par PMA au cours de la différenciation des monocytes	114
V. 1. 2. Régulation de l'expression ApoE grâce à l'interaction avec l'élément réglementaire distale du promoteur, ME.2, en particulier dans les macrophages	117

V. 1. 3. Interaction de détermination des éléments réglementaires distales du promoteur apoE cours de la différenciation des monocytes en macrophages	122
V. 1. 4. Identification du fragment minimum du promoteur apoE qui peut être activé par multienhancer 2.	128
V. 1. 5. Identification de la région minimum de ME.2 chargée de stimuler le promoteur transcriptionnel apoE	130
V. 1. 6. Effet de l'interaction de ME.2 avec d'autres promoteurs du cluster de gènes apoE/apoCI/apoCIV/apoCII dans les macrophages	132
V. 2. Les facteurs de transcription et les récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation du gène de l'ApoE	134
V. 2. 1. Modulation de l'expression apoE par des facteurs de transcription PU.1	134
V. 2. 2. Modulation de l'expression apoE par des facteurs C/EBP	136
V. 2. 3. Modulation de l'expression apoE par des facteurs de transcription AP-1	141
V. 2. 4. Action indirecte de STAT1 sur le promoteur apoE par ME.2	146
V. 2. 5. L'inhibition de l'expression de l'apoE par l'action des facteurs de stress	155
V. 2. 6. La régulation positive de l'activité du promoteur apoE par c-myb	158
V. 3. Les facteurs de transcription et des récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation génique apoCII	161
V. 3. 1. Réglage d'expression apoCII par l'interaction avec le promoteur ME.2 dans les macrophages	161
V. 3. 2. Modulation de l'expression apoCII par les facteurs de transcription STAT1	164
V. 3. 3. Modulation de l'expression apoCII par RXR	170
V. 3. 4. Transactivation du promoteur apoCII par l'interaction de STAT1 avec RXR	171
VI. Conclusions	175
VII. Bibliographie	178
Les articles publiés	210
Communication scientifiques internationales.....	211
Communications scientifiques nationales.....	213
Stages et cours de formation au decours du stage doctoral	214
Financement de la recherche	215
Liste des abréviations	216

MOTS-CLÉS

ATHEROSCLEROSE
APOLIPROTEINE
REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES
ELEMENT DE REGULATION
FACTEUR DE TRANSCRIPTION
MACROFAGES
STAT1
RXR

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique qui affecte les artères élastiques (aorte, carotide, iliaque) et musculaires (coronaires, rénales). Au début du dernier siècle, Nikolai Anitschkow a révélé le rôle du cholestérol plasmatique et des lipoprotéines dans le développement de l'athérosclérose, le rôle des apolipoprotéines dans l'athérogenèse étant démontré après l'apparition des modèles expérimentaux des souris transgéniques marquée.

L'apolipoprotéine E (ApoE) est une glycoprotéine de 35 kDa, synthétisée principalement par le foie mais aussi par d'autres tissus et cellules, y compris les macrophages. ApoE est un composant majeur ou mineur des lipoprotéines et intervient de manière essentielle dans leur métabolisme. La carence de l'apolipoprotéine E dans les modèles animaux et chez les patients diabétiques de type hyperlipoproteinemia III est associée à l'athérosclérose précoce. L'expression faible ou absente de l'apoE dans les macrophages, conduit à un processus athérogène, mais les souris transgéniques exprimant l'apoE seulement dans les macrophages ne développent pas d'athérosclérose, même lorsque les niveaux plasmatiques de l'ApoE sont faibles et les animaux sont hypercholestérolémiques. En revanche, les souris transgéniques avec des niveaux de plasma apoE normale, mais sans ApoE exprimé dans les macrophages sont susceptibles de développer une athérosclérose. Le rôle atheroprotecteur de l'apoE est principalement dû au fait que cette protéine est impliquée dans la clearance des lipoprotéines plasmatiques athérogènes (agissant comme un ligand pour plusieurs membres de la famille des récepteurs LDL) et le cholestérol en excès présent dans les cellules (en facilitant le transport inverse du cholestérol vers le foie). En outre, l'apoE a de nombreux autres avantages: antioxydant, inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, stimulation de la production d'oxyde nitrique, inhibiteur l'activation des lymphocytes T, etc. Etant donné que la modulation de l'expression de l'apoE peut entraîner des effets bénéfiques dans le métabolisme des lipoprotéines, l'apoE est considérée comme une cible thérapeutique importante pour la prévention et le traitement de l'athérosclérose.

L'apolipoprotéine apoCII est une autre protéine plasmatique, associée en particulier avec les chylomicrons et les particules VLDL. L'ApoCII est le principal activateur de la lipoprotéine lipase, une enzyme qui hydrolyse les triglycérides dans les chylomicrons et VLDL. Les principaux sites de synthèse de l'apoCII sont représentés par le foie et l'intestin, mais l'apoCII peut être synthétisé par les macrophages infiltrant la plaque d'athérome. Les patients déficients en ApoCII sont incapables d'éliminer du plasma les lipoprotéines riches en triglycérides et développent une l'hyperlipidémie de type I, caractérisée par

hypertriglycéridémie, xanthomes et un risque élevé de pancréatite et d'athérosclérose. Des études utilisant des souris transgéniques ont montré que non seulement la carence en ApoCII mais aussi la surexpression de l'apoCII induit une hypertriglycéridémie sévère. Ainsi, l'apoCII a concentration élevée inhibe l'activité de la lipoprotéine lipase, la maturation des particules HDL, le transport inverse du cholestérol et l'élimination des lipoprotéines par le biais de récepteurs de l'apoE. Par conséquent, le maintien d'un niveau optimal de l'expression de l'apoCII est essentielle pour le métabolisme normal des lipoprotéines.

L'objectif de cette thèse est de déchiffrer les mécanismes de régulation de l'expression des gènes de l'apoE et de l'apoCII (apolipoprotéines avec rôle dans le métabolisme des lipoprotéines et l'athérosclérose) dans les cellules qui jouent un rôle essentiel dans l'athérosclérose.

Modulation de l'expression de gène ApoE. Au cours de la différenciation des monocytes en macrophages l'expression du gène de l'ApoE est induite au niveau transcriptionnel par l'interaction du promoteur avec les éléments régulateurs distaux, interaction facilitée par la liaison de certains facteurs de transcription. Les résultats obtenus par la technique de 3C (chromosome conformation capture) ont démontré que, dans les monocytes qui se sont différencié en macrophages par un traitement avec de la PMA, le promoteur de l'apoE interagit avec les éléments de régulation distaux ME.1 et ME.2. L'interaction du promoteur avec la séquence d'enhancer se déroule dans l'orientation opposée entre les deux fragments d'ADN l'interaction optimale étant confirmés par des expériences de transfection transitoire.

Multienhancer 2 a induit x9 l'activité du promoteur d'apoE fois dans les cellules RAW 264.7, mais pas dans les monocytes THP-1 et d'autres types cellulaires testés (cellules HepG2 et HEK293), confirmant ainsi que l'élément régulateur distal a une activité spécifique du promoteur de l'apoE dans les macrophages. Le fragment minimum du promoteur de l'apoE qui peut être activée par multienhancer 2 est la région -100/+73. Les résultats ont montré que la séquence entière de ME.2 est nécessaire pour une interaction optimale avec du promoteur l'apoE et pour moduler l'activité du promoteur de l'apoE, la région 5'-terminale de multienhancer 2 est plus importante que la région 3`-terminale. ME.2 est un activateur de la transcription induisant l'activité de tous les promoteurs du groupe de gènes apoE/apoCI/ apoCI/apoCIV/apoCII dans les macrophages. Nos résultats ont montré que ME.2 augmente l'activité des quatre promoteurs du cluster dans l'ordre suivant apoE>apoCII>apoCIV>apoCI.

La complexité de la régulation du gène de l'apoE est le résultat de l'interaction de nombreux facteurs de transcription avec les éléments proximaux et distaux de régulation, en fonction du type de cellule dans laquelle se produit la biosynthèse de la protéine. Le rôle des facteurs de transcription PU.1, AP-1, STAT1, C/EBP et c-Myb dans la modulation de l'expression apoE a été testé par des expériences de transfection transitoire menées dans deux types cellulaires: hépatocytes (le site majeur de synthèse d'apoE) et macrophages (source périphérique d'apoE, très important car il a des implications pour le processus d'athérogenèse).

Les résultats montrent que les facteurs de transcription de la famille PU.1, impliqués dans la différenciation des monocytes en macrophages, ont un rôle positif dans la régulation de l'apoE spécifiquement dans les macrophages, agissant indirectement sur le promoteur de l'apoE par l'intermédiaire du multienhancer 2. Les facteurs de transcription C/EBP α et C/EBP β ont un effet inverse dans la régulation de l'apoE dans les macrophages et les hépatocytes; alors que la surexpression de C/EBP dans les macrophages induit l'activité du promoteur proximal de l'apoE, la surexpression de C/EBP dans les hépatocytes entraîne une augmentation significative de l'activité du promoteur. Fait intéressant, C/EBP α eu un effet plus prononcé sur l'activité du promoteur dans les hépatocytes, mais C/EBP β eu un effet plus prononcé dans les macrophages.

Les facteurs AP-1 ont des effets opposés sur l'expression de l'apoE dans les macrophages et les hépatocytes. La surexpression de facteurs de transcription c-Jun, c-Fos, Jun B et Jun D dans des macrophages RAW 264.7 a entraîné une diminution de l'activité du promoteur proximal apoE et de l'expression des gènes, alors que la surexpression de ces facteurs dans les hépatocytes HepG2 a augmenté de façon significative l'activité du promoteur et la quantité d'ARNm synthétisé. Les résultats expérimentaux ont montré que la surexpression de c-Jun entraîne une diminution de l'activité du promoteur d'ApoE, même en présence d'un inhibiteur SP, ce qui suggère que l'action de c-Jun sur le promoteur d'apoE n'est pas dépendant de la phosphorylation de c-jun.

Les résultats expérimentaux ont montré que dans les macrophages et dans les hépatocytes, la surexpression des facteurs de transcription CHOP induit une diminution significative de l'activité du promoteur proximal d'apoE, ce qui suggère que dans les conditions de l'inflammation et de stress, la quantité d'apoE synthétisée par les macrophages est réduite. Les résultats ont montré que les facteurs de transcription c-Myb ont un rôle positif dans la régulation de l'expression d'apoE, alors que la surexpression de c-Myb a induit une augmentation significative de l'activité du promoteur proximal apoE dans les

macrophages RAW 264.7 et les hépatocytes HepG2. En outre, la surexpression de c-Myb dans les cellules HEK a augmenté deux fois l'expression du gène d'apoE.

L'induction de la différenciation des monocytes en macrophages par un traitement avec de la PMA est accompagnée par une augmentation de l'expression de l'apoE et STAT1. La surexpression du facteur de transcription STAT1 induit l'activation du promoteur d'apoE grâce à l'interaction avec ME.2. Les protéines STAT1 se lient à la séquence ME.2 et détermine l'indirectement activation de la transcription du gène de l'apoE dans les macrophages (mais pas dans les hépatocytes). Le site de liaison des facteurs de transcription STAT1 sur multienhancer 2 a été identifié par de multiples voies expérimentales: transfection transitoire, précipitation de protéines sur l'ADN biotinylé et immunoprécipitation de la chromatine.

Modulation de l'expression de gène ApoCII. Les résultats présentés dans ce document démontrent que dans les macrophages multienhancer 2 peut interagir avec le promoteur du gène apoCII et cette interaction facilite l'activation transcriptionnelle du promoteur apoCII par les facteurs de transcription STAT1. Par d'expériences de transfection transitoire, la précipitation des protéines sur ADN biotinylé et immunoprécipitation de la chromatine nous avons identifié un nouveau site de liaison de STAT1 sur région -500/-493 du promoteur apoCII, responsable de l'activation induite par STAT1.

STAT1 n'a pas exercé son effet stimulant sur l'activité du promoteur apoCII lorsque sa séquence contient une mutation dans le site de liaison de RXR /T3R , ce qui suggère que le STAT1 active l'apoCII promoteur par l'interaction avec RXR . En utilisant les techniques de précipitation des protéines recombinantes avec GST et co-immunoprécipitation nous avons démontré pour la première fois une interaction physique entre les facteurs de transcription STAT1 et RXR . La transactivation du promoteur d'apoCII par STAT1 est amplifiée par le ligand RXR dans les macrophages, ce qui indique que STAT1 et RXR sont des activateurs importants dans l'expression d'apoCII.

Compte tenu du rôle essentiel de l'apoE et apoCII dans le métabolisme des lipoprotéines, ces apolipoprotéines sont des molécules cibles importantes pour le traitement de l'athérosclérose. Malgré les nombreux effets favorables de ces apolipoprotéines, la surexpression des apoE ou apoCII chez des souris transgéniques ont donné lieu à l'apparition d'une hypertriglycémie. Par conséquent, afin de prévenir ou de réduire l'athérosclérose il est nécessaire d'élaborer des stratégies visant à accroître l'expression de ces protéines seulement dans certains types de cellules ayant un rôle clé dans l'athérosclérose. Les résultats présentés dans ce document montrent la spécificité des interactions entre les

éléments distaux et promoteurs du gène de l'apoE et apoCII. En reliant certains facteurs de transcription à des éléments régulateurs distaux, l'expression de ces apolipoprotéines peut être ajustée notamment en fonction du type de cellule. Les résultats de cette étude contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'expression des gènes de l'apoE et apoCII, ce qui pourrait conduire à la découverte de nouvelles stratégies pour le traitement ou la prévention de l'athérosclérose par l'augmentation de l'expression "bénéfique" des apolipoprotéines ou en inhibant l'activité des molécules qui diminuent l'expression de ces apolipoprotéines.